



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Establecimiento de un método de diferenciación neuronal a partir de fibroblastos humanos como modelo de estudio de Ataxia Espinocerebelosa tipo 7”

Tesis que presenta

LBT. ANA VICTORIA ARREDONDO ROBLES

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Co-directores de tesis:

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Dr. Oscar Hernández Hernández

Ciudad de México

agosto, 2024

Resumen

La Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es una enfermedad autosómica dominante, caracterizada por la pérdida de las habilidades motrices finas, y degeneración retinal.

Existen diversos modelos reportados para estudiar a SCA7, sin embargo, suelen involucrar el estudio de la enfermedad en otras especies, o la reprogramación de células diferenciadas utilizando transgenes. Estas modificaciones genéticas pueden alterar el perfil epigenético de la enfermedad, por lo que se requiere de un método que preserve el contexto fisiológico de SCA7.

Para ello, se propuso el uso del coctel FICB (Forskolina, ISX9, CHIR990221, e I-BET) para reprogramar fibroblastos humanos sanos, y fibroblastos humanos con la patología de SCA7, hacia un fenotipo neural.

Mediante análisis morfológicos y la caracterización del perfil transcriptómico de las células diferenciadas, se identificaron cambios asociados a la obtención de un fenotipo neural, tales como la expresión de los marcadores neurales clásicos TUBB3, MAP2, NEFH; como la disminución de genes asociados al linaje de fibroblasto (Col1A1).

Asimismo, se identificaron factores de transcripción diferencialmente expresados entre las células sanas y las células SCA7 diferenciadas, lo que constituye una ventana a investigar para dilucidar los efectos de estas vías sobre la patogénesis de SCA7.

Abstract

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is an autosomal dominant disease, characterized by loss of fine motor skills and retinal degeneration.

There are various models reported to study SCA7, however, they usually involve the study of the disease in other species, or the reprogramming of differentiated cells using transgenes. These genetic modifications can alter the epigenetic profile of the disease, so a method that preserves the physiological context of SCA7 is required.

To this end, the use of the FICB cocktail (Forskolin, ISX9, CHIR990221, and I-BET) was proposed to reprogram healthy human fibroblasts, and human fibroblasts with SCA7 pathology, towards a neural phenotype.

Through morphological analysis and the characterization of the transcriptomic profile of the differentiated cells, changes associated with obtaining a neural phenotype are identified, such as the expression of the classic neural markers TUBB3, MAP2, NEFH, and the decrease in genes associated with the fibroblast lineage (Col1A1).

Likewise, differentially expressed transcription factors are identified between healthy cells and differentiated SCA7 cells, which constitutes a window to investigate the effects of these pathways on SCA7 pathogenesis.

Dedicatoria

A Pay, científico galardonado y revisor experto.

A la familia Arredondo Robles, por su apoyo incondicional y la motivación durante mi camino académico.

A Diego, por su paciencia, amor y compañía.

Agradecimientos

A CONAHCYT, por el apoyo económico brindado para financiar este proyecto, mediante el donativo **FORDECYT-PRONACES/2472263/2020** y la beca de maestría: 830581.

Al Dr. José Manuel Hernández Hernández, por su guía excepcional, apoyo y mentoría durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Maria Luisa Benitez Hess, auxiliar del laboratorio 5, por toda la ayuda y las enseñanzas.

A la Dra. Tzindilú Molina, por su apoyo con el equipo de microscopía confocal.

Al Dr. Oscar Hernández Hernández, el Dr. Efraín Garrido Guerrero y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por sus aportaciones y asesoría para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. David Valle, por su asesoría para llevar a cabo el análisis de datos de secuenciación de RNA.

A mi compañero y amigo Fernando Lizárraga Saavedra, por la camaradería y el trabajo juntos.

Índice de contenido

Resumen	2
Abstract.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
Índice de contenido.....	6
Abreviaturas.....	9
Índice de figuras	10
Índice de tablas	14
Introducción.....	15
1. Ataxia espinocerebelosa de tipo 7.....	15
2. ATXN7 y la formación del complejo SAGA	15
3. Características clínicas de SCA7	17
4. Prevalencia de SCA7 en México	20
5. Modelos de estudio de SCA7.....	21
5.1 Modelos celulares.....	21
5.2 Modelos de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)	21
Antecedentes.....	22
1. Conversión directa de fibroblastos a neuronas utilizando moléculas pequeñas	22
2. Coctel FICB (Forskolina, ISX9, CHIR99021, I-BET)	22
2.1 Forskolina.....	22
2.2 ISX9	23
2.3 CHIR99021	23

2.3 I-BET.....	24
Justificación.....	25
Objetivos.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares	26
Hipótesis.....	27
Metodología.....	28
1. Proliferación de fibroblastos.	28
2. Diferenciación de fibroblastos.	28
3. Evaluación de la expresión de marcadores.	28
4. Evaluación del perfil molecular de las células neuronales inducidas.	30
5. Caracterización el perfil transcripcional de las células inducidas a través de RNA-Seq	30
6. Análisis bioinformático de los resultados de secuenciación.	31
Resultados.....	32
1. Las células inducidas presentan características morfológicas semejantes a las células de tipo neural	32
2. Las células inducidas expresan el marcador neuronal TUBB3.	34
3. Las células diferenciadas exhiben diferencias en la expresión de marcadores neurales y de fibroblasto, en comparación con los fibroblastos no tratados.	35
4. Análisis del transcriptoma de las células inducidas mediante RNA-SEQ	36
4.1 Integridad de las muestras.....	36
4.2 PCA de las muestras analizadas	38
4.3 Perfil transcripcional de los fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN) en comparación con los fibroblastos sanos diferenciados (CT).....	39

4.4 Perfil transcripcional de los fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) en comparación con los fibroblastos SCA7 diferenciados (ST).	49
4.5 Perfil transcripcional de las células SCA7 tratadas, en comparación con las células controles sanos tratadas: evaluación del impacto de la enfermedad en la diferenciación	60
Discusión	69
Perspectivas	72
Conclusiones.....	73
Referencias	74
Anexos	80
1. <i>Script</i> para análisis de datos de RNA-Seq en RStudio	80

Abreviaturas

SCA7 Ataxia espinocerebelosa de tipo 7

ATXN7 Ataxina 7

PolyQ Poliglutamina

ADCAS Ataxias cerebelosas autosómicas dominantes

ZFN Dominio de dedos de zinc

NES Señal de exporte nuclear

NLS Señal de localización nuclear

SAGA Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa

TAF Factores asociados a TBP

TRRAP Proteína asociada a dominio de transformación/transcripción

HAT Acetiltransferasa de histonas

DUB Desubiquitinasa

SPL Módulo de splicing

TF Factores de transcripción

iPSC Células madre pluripotentes inducidas

trkB receptor de tropomiosina relacionado a la quinasaB

CamK cinasa calcio-modulina

CN Fibroblastos controles sanos no tratados

CT Fibroblastos controles sanos tratados

SN Fibroblastos SCA7 no tratados

ST Fibroblastos SCA7 tratados

Índice de figuras

Fig. 1. Estructura y dominios de ATXN7.	16
Fig. 2. Organización esquemática del complejo SAGA.	17
Fig 3. Mecanismos de patogénia de SCA7.....	20
Fig. 4. Coctel FICB.	24
Fig. 5. Micrografías en 10X de los fibroblastos sanos y con SCA7 sometidos a tratamiento con el coctel FICB a lo largo de 16 días.....	32
Fig. 6. Análisis morfométrico de las células diferenciadas.	34
Fig. 7. Expresión de TUBB3 en las células inducidas.....	35
Fig. 8. Expresión de marcadores neurales y de fibroblasto.	36
Fig. 9. Geles de integridad de RNA en agarosa 1 %	37
Fig. 10. Geles de integridad de RNA en agarosa 1 %.	38
Fig. 11. PCA de las muestras analizadas	39
Fig. 12. Genes diferencialmente expresados entre controles sanos no diferenciados (CN) y diferenciados (CT).....	40
Fig. 13. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la alza.....	41
Fig. 14. <i>Heatmap</i> de los genes diferencialmente expresados entre controles no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la alza	42
Fig. 15 <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT).....	44

Fig. 16. <i>Heatmap</i> del <i>Cluster 1</i> del <i>Functional Annotation Cluster</i> ; comparación CN vs CT a la alza	45
Fig. 17. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la baja	46
Fig. 18. <i>Heatmap</i> de los genes diferencialmente expresados entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la baja.....	47
Fig. 19. <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT).....	48
Fig. 20. <i>Heatmap</i> del <i>Cluster 1</i> del <i>Functional Annotation Cluster</i> ; comparación CN vs CT a la baja.....	49
Fig. 21. Genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) y diferenciados (ST).	50
Fig. 22 Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) y fibroblastos SCA7 diferenciados (ST) a la alza.....	51
Fig. 23. <i>Heatmap</i> de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) y tratados (ST) a la alza.....	52
Fig. 24. Expresión de los marcadores neurales TUBB3 y MAP2.	54
Fig. 25. <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la alza entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST).....	55
Fig. 26. <i>Heatmap</i> del <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la alza entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST).	56
Fig. 27 Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) y fibroblastos SCA7 diferenciados (ST) a la baja	57

Fig. 28. <i>Heatmap</i> de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST) a la baja.	58
Fig. 30. <i>Heatmap</i> del <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la baja entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST).	60
Fig. 31. Comparación del perfil transcriptómico entre fibroblastos controles sanos y fibroblastos SCA7, ambos con el tratamiento del coctel FICB.	61
Fig. 32. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados a la alza, entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente.	62
Fig. 33. <i>Heatmap</i> de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente.	62
Fig. 34. <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente.	63
Fig. 35. <i>Heatmap</i> del <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente.	64
Fig. 36. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados a la baja, entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente.	65
Fig. 37. <i>Heatmap</i> de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente.	66
Fig. 38. <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente.	66
Fig. 39. <i>Heatmap</i> del <i>Functional Annotation Clustering</i> de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente.	67

Fig. 40 *Heatmap* del *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente; énfasis en factores de transcripción. 68

Índice de tablas

Tabla 1. Asociación del tamaño de repetidos con la penetrancia de la enfermedad.....	17
Tabla 2. Asociación del tamaño de repetidos, con la edad de inicio de los síntomas y la descripción clínica específica.	18
Tabla 3. Secuencias de los marcadores neuronales y de fibroblasto utilizados para PCR punto final y tiempo real.....	29
Tabla. 4. Concentraciones de las muestras de RNA de fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN) y diferenciados (CT).	36
Tabla. 5. Concentraciones de las muestras de RNA de los fibroblastos SCA7 No diferenciados (SN) y fibroblastos SCA7 diferenciados (ST).....	37

Introducción

1. Ataxia espinocerebelosa de tipo 7

La ataxia espinocerebelosa de tipo 7 (SCA7) es una enfermedad neurodegenerativa, autosómica dominante, que se origina por la expansión CAG en el gen de ataxina 7 (ATXN7), que origina un tracto de poliglutamina (PolyQ) en la proteína que codifica [1].

SCA7 pertenece a un grupo de ataxias cerebelosas autosómicas dominantes conocido como ADCAS. En general, se considera que son desórdenes raros, con prevalencias de 0.3 a 2 por 100,000 nacidos vivos, que se caracterizan por atrofia del cerebelo, tallo, y degeneración de diversas estructuras celulares. [1, 2]. Las ADCAS se categorizan en tres tipos: las tipo I se caracterizan por ataxia cerebelar con rasgos neurológicos variables; las tipo III presentan ataxia cerebelar pura; y las tipo II, en donde solo se encuentra SCA7, se distinguen por la presencia de maculopatía pigmentaria adicional [3].

2. ATXN7 y la formación del complejo SAGA

El gen ATXN7 se expresa de forma ubicua, tanto en tejidos neurales como no neurales. Suele expresarse en citoplasma o en el núcleo celular, siendo la localización un proceso controlado por el empalme alternativo de su pre-mRNA. De esta forma, da lugar a dos isoformas, ATXN7a (predominantemente nuclear) y ATXN7b (predominantemente citoplasmática). Estas isoformas comparten un tracto de poliglutamina (PolyQ), un dominio de dedos de zinc (ZFN), un dominio ATXN7, sitios de modificación postraduccional (acetilaciones y SUMOilaciones), señales de localización nuclear, y señales de exporte nuclear. Se diferencian por la extensión de su dominio carboxilo terminal, siendo de 892 aminoácidos en la isoforma a, y de 945 aminoácidos en la isoforma b (Fig. 1). [1, 4].

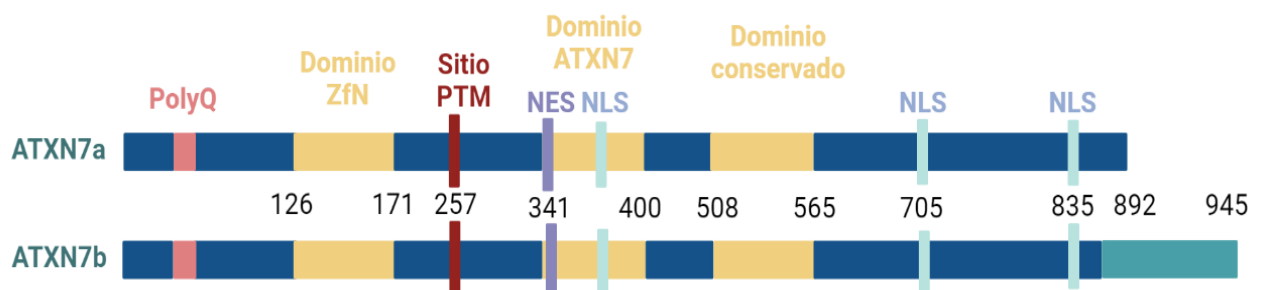


Fig. 1. Estructura y dominios de ATXN7. En rosa, se señala el dominio PolyQ, susceptible a cambios en el número de repetidos CAG que le conforman. En amarillo, se muestran los dominios conservados entre las dos isoformas: un dominio de dedos de zinc (ZNF), un dominio Cys-X9-10-Xys-X5-Cys-X2-His (dominio ATXN7), y un dominio conservado. En rojo, se señala un sitio susceptible a modificaciones postraduccionales, tales como acetilaciones y SUMOilaciones. En morado, se señala un sitio de exporte nuclear (NES). En azul, se señalan tres dominios de localización nuclear (NLS). Modificado de Niewiadomska-Cimicka *et al.*, 2019.

ATXN7a, predominantemente localizada en el núcleo, forma parte de un complejo de coactivadores transcripcionales conocido como complejo SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa), involucrado en el proceso de remodelación de la cromatina [2].

El complejo SAGA (Fig. 2) regula la expresión génica al interactuar con activadores unidos a *enhancers*, de modo que recluta a la maquinaria transcripcional y modifica a los dominios de cromatina proximales al promotor. Está conformado por cinco dominios funcionales : un centro de anclaje que incluye factores asociados a TBP (TAFs), una proteína asociada a un dominio de transformación/transcripción (TRRAP), una acetiltransferasa de histonas (HAT), una desubiquitinasa (DUB) y un módulo de *splicing* (SPL) [5].

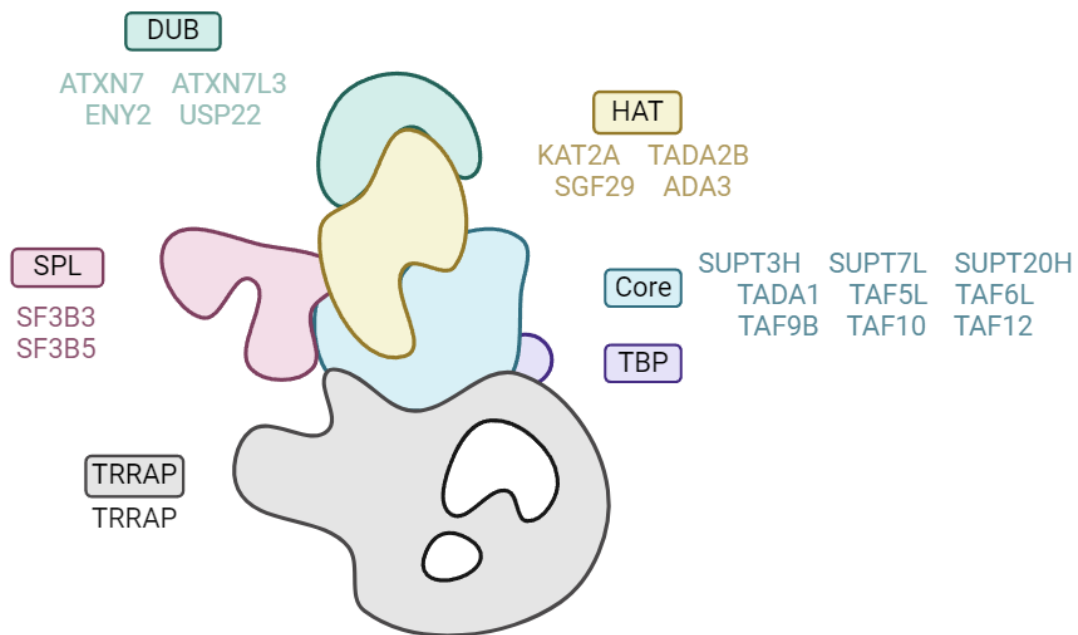


Fig. 2. Organización esquemática del complejo SAGA. En verde, se muestra el módulo de actividad desubiquitinasa (DUB), conformado por ATXN7, ATXN7L3, ENY2, y USP22. En amarillo, se muestra el módulo de acetiltransferasas de histonas (HAT), compuesto por KAT2A, TADA2B, SGF29 y ADA3. En azul, se muestra el core o centro de andamiaje, compuesto por SUPT3H, SUPY7L, SUPT20H, TADA1, TAF5L, TAF6L, TAF9B, TAF10, y TAF12. En morado, se muestra a TBP asociado al *core*. En rojo, se muestra el módulo de splicing, compuesto por SF3B3 y SF3B5. En negro, se muestra el módulo de proteína asociada a un dominio de transformación/transcripción (TRRAP). Modificado de Herbst *et al.*, 2021.

3. Características clínicas de SCA7

El tamaño de repetidos presentes en el tracto de poliglutamina en SCA7 se asocia con la penetrancia de la patología. En este sentido, se considera que un alelo normal contiene entre 7 y 27 repetidos; cuando existen más de 37 repetidos en el tracto, se considera que la patología tiene una penetrancia completa (tabla 1) [6].

Tabla 1. Asociación del tamaño de repetidos con la penetrancia de la enfermedad

Alelo	Tamaño de repetidos
Normal	7-27
Normal mutable	28-33
Patogénico. Penetrancia reducida	34-36
Patogénico. Penetrancia completa.	37-460

De forma general, la patología de SCA7 se caracteriza por anomalías en la marcha, el deterioro de las habilidades motoras finas, problemas cardíacos, anomalías en el movimiento ocular y temblores. Sin embargo, existe una correlación inversa en cuanto a la

extensión del tracto de repetidos y la edad de inicio de los síntomas. Asimismo, el tamaño del tracto se relaciona con las características clínicas presentadas. Cuando el tamaño de repetidos supera a 200, los síntomas inician en la infancia, y se caracterizan por pérdida neuronal y gliosis. Cuando los repetidos se encuentran entre 59 y 200, los síntomas se presentan antes de los 20 años, y se caracterizan por la pérdida de la capacidad visual. Cuando los repetidos no superan a 59, la enfermedad suele iniciar en la adultez (después de los 30 años), y se distingue por ataxia cerebelar, disartria y disfagia (tabla 2) [6].

Tabla 2. Asociación del tamaño de repetidos, con la edad de inicio de los síntomas y la descripción clínica específica.

Edad de inicio de los síntomas	Tamaño de repetidos	Descripción clínica
Infancia	200-400	Pérdida neuronal (especialmente células de Purkinje), pérdida de fibras mielinizadas, gliosis en el cerebelo
Adolescencia (<30 años)	59<	Pérdida de visión acompañada de ataxia mínima. Hemeralopía (inhabilidad de ver claramente en luz brillante), fotofobia (sensibilidad extrema a la luz), pérdida de la discriminación del color
Adultez (>30 años)	<59	Ataxia cerebelar (manifestada por dificultad en la marcha, destreza manual y habla), disartria, disfagia, hipoacusia, anormalidades en el movimiento ocular.

3. Mecanismos de patogenia de SCA7

En la patogenia de SCA7, se reconocen una serie de mecanismos que inducen a la neurodegeneración observada en la enfermedad, y a la prevalencia del mensajero de ATXN7 en su forma mutada [1] (Fig. 3). Estos se enlistan a continuación:

- Alteraciones epigenéticas y transcripcionales. En modelos murinos de SCA7, se ha observado que los fotoreceptores muestran descondensaciones de cromatina severas, así como una serie de genes asociados a bastones regulados a la baja por el reclutamiento aberrante del complejo SAGA, lo que conlleva a la disfunción visual de estos ratones [1, 7]
- Plegamiento aberrante. Los agregados en ATXN7 pueden provocar el secuestro de diversos factores, lo que les impide cumplir con su función biológica. Por ejemplo, existe evidencia del secuestro del co-activador CBP en otras enfermedades inducidas por agregados, como la enfermedad de Huntington. De forma interesante, la expresión de CBP parece estar reprimida en SCA7 [1, 8, 9]
- Autofagia deficiente. Se han observado defectos en las vías autofágicas en SCA7. En el estado patológico, ATXN7 reduce la actividad autofágica mediante la disrupción de dos proteínas clave en la iniciación de la autofagia (FIP200 y ULK1) a través de p53; mediante la interacción aumentada de p53 con FIP200, y la coagregación de p53 con FIP200 en los agregados de ATXN7, existe una disminución de los niveles solubles de FIP200, así como una desestabilización en ULK1 [1, 10].
- Sobrecarga de clastosomas. La actividad degradativa de los clastosomas puede estar sobrepasada por la patología, de modo que el mecanismo no es suficiente para degradar al mensajero de ataxina mutante [1].
- Disfunción metabólica. Se han observado deficiencias en la tasa de consumo de oxígeno e intercambio de gases en modelos murinos con SCA7. Del mismo modo, las neuronas de Purkinje de ratones con SCA7 muestran fragmentaciones en la red mitocondrial [1, 11]
- Apoptosis. En modelos murinos con SCA7, se han observado procesos de degeneración de fotoreceptores asociados con la agregación en el tracto polyQ. [1, 12].

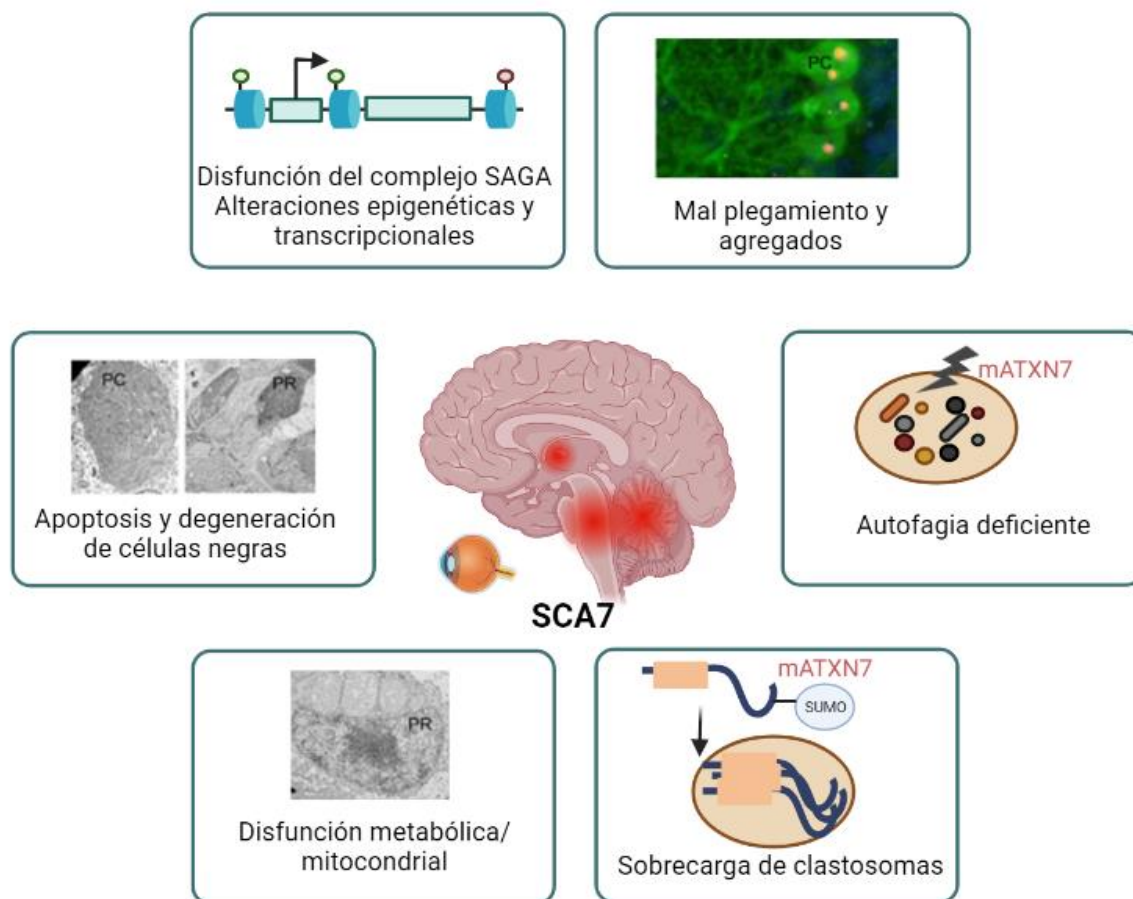


Fig 3. Mecanismos de patogénesis de SCA7. Se muestran algunos de los mecanismos reconocidos en la patogénesis de SCA7: alteraciones transcripcionales, defectos de plegamiento y secuestro de factores en agregados, autofagia deficiente, clastosomas sobrecargados, disfunciones metabólicas y apoptosis y degeneración celular. Modificado de Niewiadomska-Cimicka *et al.*, 2019.

4. Prevalencia de SCA7 en México

SCA7 es una enfermedad rara, con una prevalencia variable. En México, se considera que el 7.4% de las ataxias presentadas son casos de SCA7 [12], y se ha identificado un efecto fundador que concentra la incidencia de la enfermedad en Jalapa, Veracruz [13, 14].

En 2013, Magaña y colaboradores utilizaron análisis de genotipificación para identificar la mutación responsable de los casos de SCA7 en Veracruz. De acuerdo con sus hallazgos, se encontró que los pacientes portadores estudiados, comparten el haplotipo A-254-82-98 para el marcador 3145G/A, así como los marcadores centroméricos D3S1287, D3S1228 y

D3S3635. Además, encontraron que los portadores tenían ancestría del oeste de Europa, lo que permitió conjeturar el origen ancestral de estas mutaciones [15].

5. Modelos de estudio de SCA7

Los hallazgos respecto a los mecanismos de patogenia de SCA7 suelen derivarse de modelos murinos *Knock-In* y modelos transgénicos, así como de reprogramación directa entre linajes divergentes mediante la introducción de factores de transcripción reguladores [16, 17].

5.1 Modelos celulares

Dado que las células gliales de Müller desempeñan un papel esencial en la homeostasis de la retina, Suárez y colaboradores generaron un modelo inducible para SCA7, basado en la línea celular glial Müller MIO-M1, con el que encontraron foci nucleares y citoplasmáticos que contenían RNA mutante acompañados de defectos de empalme alternativo. También se observaron foci de RNA en células de diferentes linajes, incluidos los leucocitos mononucleares periféricos derivados de pacientes de SCA7 [18].

5.2 Modelos de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Se ha demostrado que la conversión directa de fibroblastos en células madre neurales inducidas (iNSC) depende de un par de factores de transcripción (TF) progenitores neurales clave, lo que plantea la cuestión de si dicha reprogramación directa puede lograrse mediante TF progenitores no neurales. Xiao y colaboradores informaron que el progenitor no neural *Ptf1a* es suficiente para reprogramar directamente fibroblastos de ratón y humanos en iNSC auto renovables capaces de diferenciarse en neuronas funcionales, astrocitos y oligodendrocitos, y mejorar la disfunción cognitiva de los modelos de ratón con enfermedad de Alzheimer cuando se trasplantan. La actividad de reprogramación de *Ptf1a* depende de su interacción independiente de Notch con *Rbpj*, lo que conduce a la activación posterior de la expresión de los genes TF y la señalización de Notch necesaria para la especificación, la autorrenovación y la homeostasis de NSC [19].

Antecedentes

1. Conversión directa de fibroblastos a neuronas utilizando moléculas pequeñas

En 2015, Li y colaboradores mostraron un modelo de diferenciación a partir de fibroblastos de ratón hacia células neuronales, utilizando solo un cóctel de moléculas pequeñas, con un rendimiento de hasta > 90% siendo TUJ1 positivo después de 16 días de inducción [20].

Utilizando el coctel compuesto de las moléculas Forskolina, ISX9, CHIR99021 e I-BET (FICB), que actúa de forma sinérgica, se obtuvieron células inducidas con un fenotipo neural heterogéneo. Entre la población obtenida, se encontraron células positivas a Syn1 (consistentes con neuronas presinápticas), Gad67 (consistentes con neuronas inhibitorias), y vGlut (consistentes con neuronas glutamatérgicas), entre otros marcadores neuronales. Además, las células inducidas presentaron un aumento gradual, desde las 24 h de tratamiento, de marcadores involucrados en el establecimiento del linaje neural, tales como NeuroD1 y Ngn2. Del mismo modo, mostraron una disminución importante en la expresión de distintos marcadores del linaje de fibroblastos, tales como Snail1 y Twist2 [20].

Su análisis constituyó una "prueba de principio" para la reprogramación directa inducida químicamente de los destinos de las células somáticas a través de las capas germinales sin manipulación genética, a través de la interrupción de los programas específicos de las células y la inducción de un destino alternativo [20].

2. Coctel FICB (Forskolina, ISX9, CHIR99021, I-BET)

Se utilizó un inhibidor de bromodominio de la familia BET, I-BET151, capaz de interrumpir el programa específico de fibroblastos. El inductor de neurogénesis ISX9, por otro lado, se utilizó como activador de los genes específicos de neuronas. Forskolina y CHIR0992 se utilizaron como *boosters* químicos. En conjunto, este coctel se denomina coctel FICB [20].

2.1 Forskolina

La forskolina es un diterpeno originado de la planta *Coleus forskohlii*. Tiene la capacidad de activar directamente a la enzima adenilato ciclasa, para incrementar los niveles intracelulares

de cAMP. A su vez, este aumento promueve la expresión de PKA/CREB1, un complejo que inhibe vías de señalización apoptóticas -tales como la vía JNK-, de modo que favorece la supervivencia neuronal [21].

A través de la vía PKA/CREB1, forskolina es capaz de activar a las isoformas del receptor de tropomiosina relacionado a la quinasa B (trkB), cuya expresión es requerida para el mantenimiento y función del sistema nervioso (Fig. 4) [22]

2.2 ISX9

La molécula sintética isoxazol 9 (ISX9) ha sido utilizada para promover la diferenciación neuronal en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo en modelos murinos. Además, existe evidencia de su capacidad para restaurar la neurogénesis después de la inducción de estrés [23, 24].

ISX9 induce la diferenciación neuronal en forma robusta, a través de la proliferación incrementada de neuroblastos. Esta molécula actúa a través de la cinasa calcio-calmodulina (CamK) para inducir una vía de señalización activada por calcio que fosforila a la histona desacetilasa 5; en consecuencia, se promueve la expresión del factor *enhancer* de miocitos (MEF) [25, 26]. MEF2, a su vez, promueve el desarrollo del sistema nervioso a través de la regulación del crecimiento de neuritas en neuronas positivas a Tuj-1 *in vitro*, y la diferenciación de células troncales neurales embrionarias *in vivo* (Fig. 4) [26].

De acuerdo con la reprogramación realizada por Li y colaboradores en 2015, ISX9 es capaz de inducir por sí solo la expresión de los genes neuronales Ngn2, NeuroD1, NF-H, Syn1 y Tau. Sin embargo, esta expresión es significativamente mayor cuando todas las moléculas se utilizan en complejo, por lo que se piensa que el coctel FICB actúa de forma sinérgica [20]

2.3 CHIR99021

La molécula CHIR99021 actúa como un potenciador en el proceso de reprogramación hacia el linaje neural, porque es un inhibidor de la cinasa serina/treonina GSK3 β . Durante el desarrollo neural, esta cinasa controla los niveles, unión y localización de factores de

transcripción como CREB, Nfat, Ngn2, SMAD1 y β -catenina, así como la actividad de diversas proteínas involucradas en el desarrollo axonal [27].

GSK3 β media a la vía canónica Wnt/ β . En presencia de Wnt, o la ausencia de GSK3 β , se reduce la fosforilación de β -catenina, y la degradación permite que β -catenina se acumule en el citoplasma, se transloque al núcleo y conlleve a la regulación transcripcional de los genes blancos de Wnt. De este modo, la inhibición de GSK3 β , estabiliza a β -catenina, y activa la vía Wnt (Fig. 4) [27].

2.3 I-BET

I-BET es una molécula inhibidora de proteínas con bromodominio BET Brd2, Brd3 y Brd4 durante la diferenciación de células progenitoras neurales. Las proteínas BRET se reconocen como factores clave en la elongación transcripcional, de modo que su inhibición promueve la diferenciación de las células progenitoras hacia neuronas, a la vez que suprime la progresión del ciclo celular (Fig. 4) [28, 29].

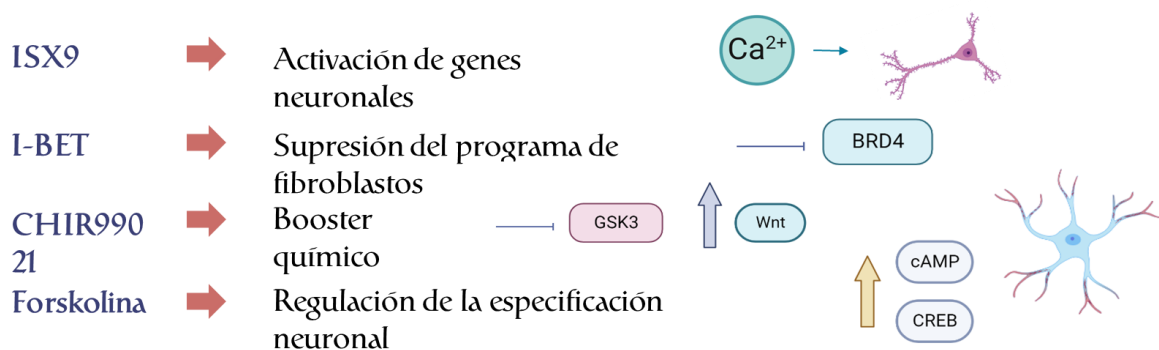


Fig. 4. Coctel FICB. Actividades principales de las moléculas utilizadas en la reprogramación celular hacia el fenotipo neural [21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29].

Justificación

La ataxia espinocerebelosa de tipo 7 (SCA7) es una enfermedad neurodegenerativa, autosómica dominante, que se origina por la expansión de un tracto de poliglutamina (PolyQ) en el gen de ataxina 7 (ATXN7). A pesar de ser una enfermedad rara, existen fenómenos como el efecto fundador en Veracruz, México, en donde la prevalencia de SCA7 es alta.

SCA7 suele estudiarse mediante modelos murinos que presentan alelos con repetidos patogénicos, o mediante células reprogramadas a través de la inducción viral de factores de transcripción. Estos métodos podrían no representar el panorama patogénico completo al limitarse a un número específico de repetidos, o el método de reprogramación puede ser desventajoso, ya sea por los costes añadidos, tiempo, la posibilidad de integración inespecífica en el genoma, o la inmunogenicidad asociada.

Por estas razones, se requiere de un método más acercado al contexto fisiológico, no inmunogénico, que permita el estudio de los mecanismos patogénicos de SCA7. Se plantea, entonces, el establecimiento de un método de diferenciación neuronal, basado en moléculas pequeñas, a partir de fibroblastos de pacientes con SCA7, que sirva de modelo de estudio para la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general:

- Establecer y caracterizar la diferenciación de fibroblastos de pacientes de ataxia espinocerebelosa tipo 7 a neuronas, a través de la utilización de las moléculas pequeñas ISX9, I-BET151, CHIR9902I y Forskolina.

Objetivos particulares:

1. Establecer las condiciones óptimas de inducción neuronal, y caracterizar el perfil morfológico de las células neuronales durante el proceso de inducción neuronal.
2. Caracterizar la expresión de marcadores de diferenciación neuronal y del programa específico de fibroblastos, a nivel de mRNA y proteína de las células neuronales inducidas.
3. Analizar el perfil transcripcional de las células neuronales inducidas a través de RNA-seq.

Hipótesis

El coctel basado en las moléculas pequeñas ISX9, CHIR99021, I-BET y Forskolina será capaz de convertir fibroblastos humanos de pacientes con Ataxia Espinocerebelosa de tipo 7 hacia un fenotipo neuronal, constituyendo un modelo de diferenciación eficiente.

Metodología

1. Proliferación de fibroblastos.

Los fibroblastos controles sanos (GM03440) y fibroblastos con la patología de SCA7 -con 8 y 54 repetidos, respectivamente- (GM03561) se mantuvieron en medio DMEM (Gibco), suplementado con suero fetal bovino 20% y penicilina-estreptomicina 1%.

2. Diferenciación de fibroblastos.

Las placas a sembrar fueron tratadas con colágena 1%, para evitar el desprendimiento de las células diferenciadas. Los fibroblastos de controles sanos y SCA7 se mantuvieron en medio DMEM hasta alcanzar una confluencia > 90%. Después, el medio fue sustituido por un medio de inducción, compuesto por medio neurobasal (Gibco), N2 (Gibco) 1%, B27 (Gibco) 2%, GlutaMAX (Gibco) 1%, Penicilina-Estreptomicina 1%, bFGF (100-250 ng/mL), y suplementado con Forskolina (TOCRIS) 100 μ M, CHIR99021 (TOCRIS) 20 μ M, ISX9 (TOCRIS) 20 μ M, e I-BET151 (TOCRIS) 0.5 μ M (coctel FICB). Los tratamientos se mantuvieron por 16 días, con cambios de medio y moléculas cada 3 días.

3. Evaluación de la expresión de marcadores.

Una vez terminados los tratamientos, se realizó una extracción de RNA por el método Trizol-cloroformo. A las placas p60, se retiró el medio de crecimiento, se realizó un lavado con PBS para retirar los restos de medio, y se añadieron 400 μ L de Trizol. Posteriormente, se homogeneizó mediante pipeteo y vortex por 30 segundos, y se mantuvo a 4°C durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Después, se agregaron 80 μ L de cloroformo, se incubó por 3 minutos, y se centrifugó por 15 minutos a 12,000 x g a 4° C. La fase acuosa resultante se transfirió a un nuevo tubo.

Para precipitar el RNA, se añadieron 200 μ L de isopropanol, se incubó por 10 minutos, y se centrifugó por 10 minutos a 12,000 x g a 4°C. El sobrenadante se decantó, y la pastilla resultante fue resuspendida en 1 mL de etanol 75%. Los tubos se vortexearon brevemente, y se centrifugaron por 5 minutos a 7500 x g a 4°C. Del mismo modo, se decantó el sobrenadante, y la pastilla se dejó secar por 5 minutos.

Cada pastilla fue resuspendida en 30 μ L de agua libre de RNAsas. El contenido y calidad del RNA obtenido fueron analizados mediante espectrofotometría (NANODROP). De igual

manera, la integridad del RNA fue corroborada mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1 %.

El RNA obtenido se utilizó para generar cDNA mediante RT-PCR. Para ello, se preparó una mezcla (A) con 1.5 μL Oligo dT [500 μM] (Invitrogen), 1 μg de RNA total, 1 μL dNTPs Mix [10 nM] (Invitrogen), y H₂O libre de RNAsas para ajustar a 12 μL , que fue calentada a 65°C por 5 minutos. Después, la mezcla se colocó a 4°C para añadir una segunda mezcla (B), con 4 μL de buffer first-strand 5X (Tris-HCl [250 mM], pH 8.3, KCL [375 mM], MgCl₂ [15 mM]), 2 μL de DTT [50 mM] (Invitrogen), y 1 μL H₂O libre de RNAsas.

En conjunto, se incubó a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 μL de la retrotranscriptasa RT-MMLV (200 U/ μL), y se incubó por 50 minutos a 37°C, y por 10 minutos a 70°C.

Una vez preparado el cDNA de todos los tratamientos, se realizó una amplificación por PCR punto final, para evaluar la calidad de los primers a utilizar. Para ello, se preparó una mezcla con 5 μL de Master Mix (Taq DNA Polimerasa, dNTPs, MgCl₂), 0.5 μL Primer Forward, 0.5 μL de Primer Reverse (Tabla 3), 2 μL cDNA, y 2 μL H₂O libre de RNAsas. La amplificación se llevó a cabo siguiendo una incubación de 2 min a 94°C, 30 ciclos de 94°C/45s, 60°C/35s, y 72°C/90s. Posteriormente, se permitió la extensión total por 72°C/7 minutos. Los productos fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Una vez verificados los productos por PCR punto final, se realizaron PCRs en tiempo real, considerando duplicados biológicos de cada muestra. Para ello, se utilizó el reactivo SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems), y las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 95°C/ 2 minutos
- Hold Activation Elongation 70°C/10 minutos (40 ciclos)
- Alineamiento 50°C/2 minutos (40 ciclos)
- Disociación 90°C/15 minutos

Tabla 3. Secuencias de los marcadores neuronales y de fibroblasto utilizados para PCR punto final y tiempo real.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
hsTBP	GCTGTTTAACTTCGCTTCCG	GCTGTTTAACTTCGCTTCCG
Ngn2	AAACCATCTCACTTCACAGGG	ATAAGCTCCATCACACCTTCAG
NeuroD1	TCCCATGTCTTCCACGTTAAG	GAGAAGTTGCCATTGATGCTG
TUBB3	CCCAGCGGCAACTACGTGGG	GTTGTTGCCGGCCCCACTCT
MAP2	TGGGGGCGGAAATGTACAAA	CCAACCTTAGCTTGGGCCTT
Coll1a1	GCTTATGAAACCCCAATGCTG	GATTGGGAAGGAGTGGAGG

4. Evaluación del perfil molecular de las células neuronales inducidas.

Las células inducidas fueron sometidas a inmunofluorescencia para detectar la expresión del marcador neuronal B-III tubulina, utilizando como control los fibroblastos no diferenciados de ambas condiciones.

Los fibroblastos fueron crecidos y tratados en cubreobjetos de vidrio. Una vez terminado el tiempo de diferenciación, se retiró el medio, se lavó con PBS 1X, y se añadió formaldehído al 4% por 10 minutos. Retirado el formaldehído, se agregó Tritón 0.1% por 5 minutos, y se lavó con PBS 1X.

Luego, se realizó un bloqueo con BSA 3% por 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario en BSA 3% durante toda la noche. Como anticuerpo primario, se utilizó el anticuerpo anti-beta III tubulina (Abcam, no. catálogo: AB18207).

En condiciones de oscuridad, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X, 3 veces por 5 minutos. Después, se añadió el anticuerpo secundario (ALEXA 484 anti-conejo) en BSA 3%, 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron nuevamente lavados con PBS 1X, y se incubaron con DAPI durante 5 minutos.

Las inmunofluorescencias se visualizaron en el microscopio confocal Stellaris del Centro de Investigación sobre el Envejecimiento.

5. Caracterización el perfil transcripcional de las células inducidas a través de RNA-Seq.

Se realizó una extracción de RNA mediante el método Trizol-Cloroformo (descrito en el punto 3 de esta sección) de las células inducidas. Este material se analizó para asegurar su

calidad, mediante la determinación de concentración por el equipo Nanodrop, y un gel de integridad en agarosa al 1%. Después, fue enviado para su secuenciación mediante la tecnología Nanoballs.

6. *Análisis bioinformático de los resultados de secuenciación.*

Los archivos resultantes del proceso de secuenciación fueron sometidos a un análisis de calidad utilizando el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), que genera un archivo .html en donde resume distintos parámetros de calidad que han de cumplir las secuencias: estadísticas básicas del archivo .fq.gz, calidad de la secuencia por base, scores de calidad por secuencia, contenido por base, contenido de GC por secuencia, niveles de secuencias duplicadas en la librería, y secuencias sobrerrepresentadas.

Una vez asegurada la calidad de las secuencias obtenidas, se realizó un alineamiento con el programa Hisat2 (<https://daehwankimlab.github.io/hisat2/>), utilizando 5 hilos de búsqueda paralelos, la búsqueda de 2 alineamientos primarios distintos para cada lectura, y reportando únicamente los alineamientos dentro de los transcritos conocidos. Con ello, se generó un archivo de alineamiento .bam, que luego fue convertido en un archivo más ligero .sam, utilizando el la herramienta SAM2BAM de la *suite* SamTools (<https://www.htslib.org/>). Este archivo se clasificó con la herramienta sort, y se generó un índice con la herramienta index de la misma *suite*.

Con el índice generado, se utilizó la plataforma RStudio para generar las listas de los genes diferencialmente expresados, a la alza y a la baja, para cada comparación de condiciones (fibroblastos controles sanos y SCA7 no tratados, y fibroblastos controles sanos y SCA7 tratados). En la sección Anexos, se incluye el *script* utilizado.

Para la generación de heatmaps o mapas de calor, se utilizó el sitio web ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>). Para los análisis de ontología, se utilizó el sitio web ShinyGo 0.80 (<https://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). Y, para los análisis de *Functional Annotation Clustering*, se utilizó la herramienta David Tools (<https://david.ncifcrf.gov/#>).

Resultados

1. Las células inducidas presentan características morfológicas semejantes a las células de tipo neural

Con el objetivo de establecer un cambio en el linaje celular de los fibroblastos orientado hacia un fenotipo neural, se generaron cultivos de fibroblastos controles sanos (GM03440) y fibroblastos con la patología de SCA7 (GM03561) que fueron inducidos mediante el coctel FICB por 16 días.

Al término de los 16 días de tratamiento, se observaron cambios morfológicos importantes en las células inducidas, caracterizados por la presencia de somas y prolongaciones citoplasmáticas que asemejan a neuritas. Estos cambios son aparentes desde el día 3 de diferenciación, y ocurren de forma similar en ambas condiciones (Fig. 5).

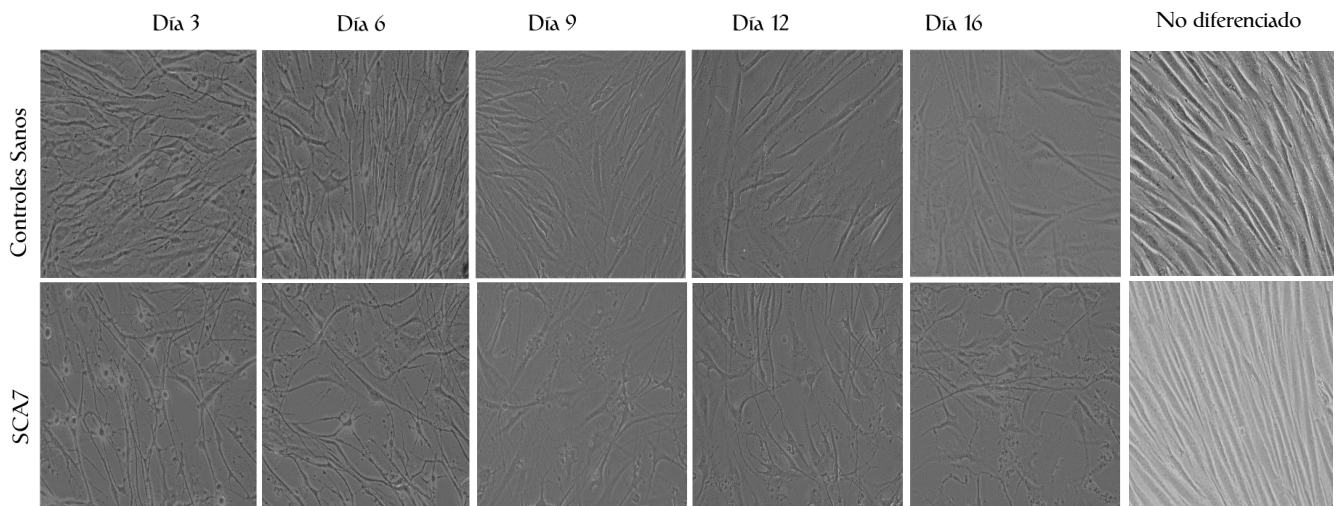
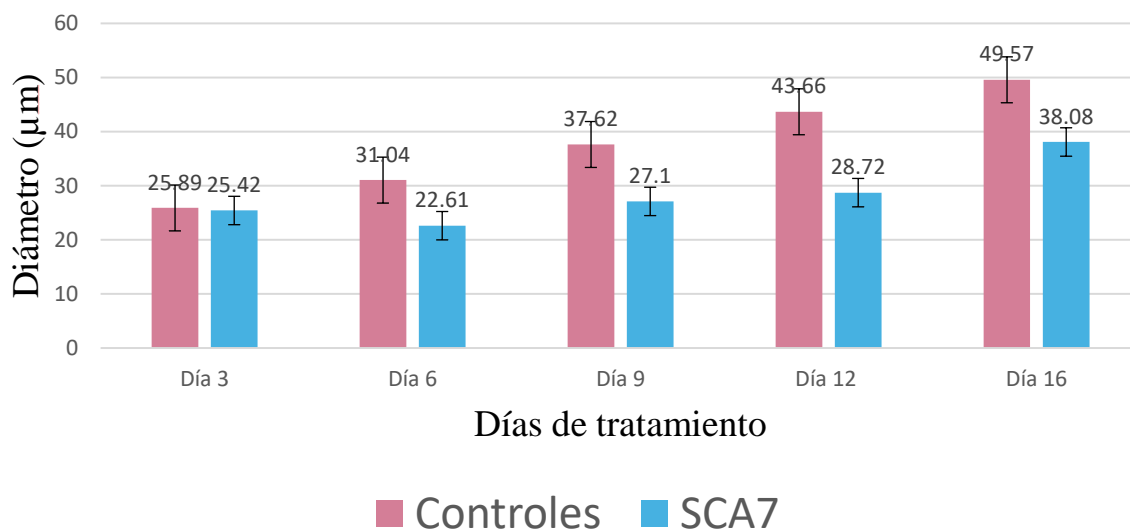


Fig. 5. Micrografías en 10X de los fibroblastos sanos y con SCA7 sometidos a tratamiento con el coctel FICB a lo largo de 16 días. Se muestra la progresión del tratamiento en los días 3, 6, 9, 12 y 16. A la derecha, se muestran la morfología de los fibroblastos previa a la diferenciación.

Se realizó una medición del diámetro de los somas y de la longitud de las prolongaciones citoplasmáticas con el *software* ImageJ. En este análisis, se observó que en ambas condiciones hay un aumento gradual en el tamaño de estas estructuras; sin embargo, parece

haber una diferencia con respecto a la diferenciación de las células SCA, pues presentan medidas menores en comparación con las células control inducidas (Fig. 6).

Diámetro de somas (μm) Controles tratados vs SCA7 tratados



Longitud de dendritas (μm) Controles tratados vs SCA7 tratados

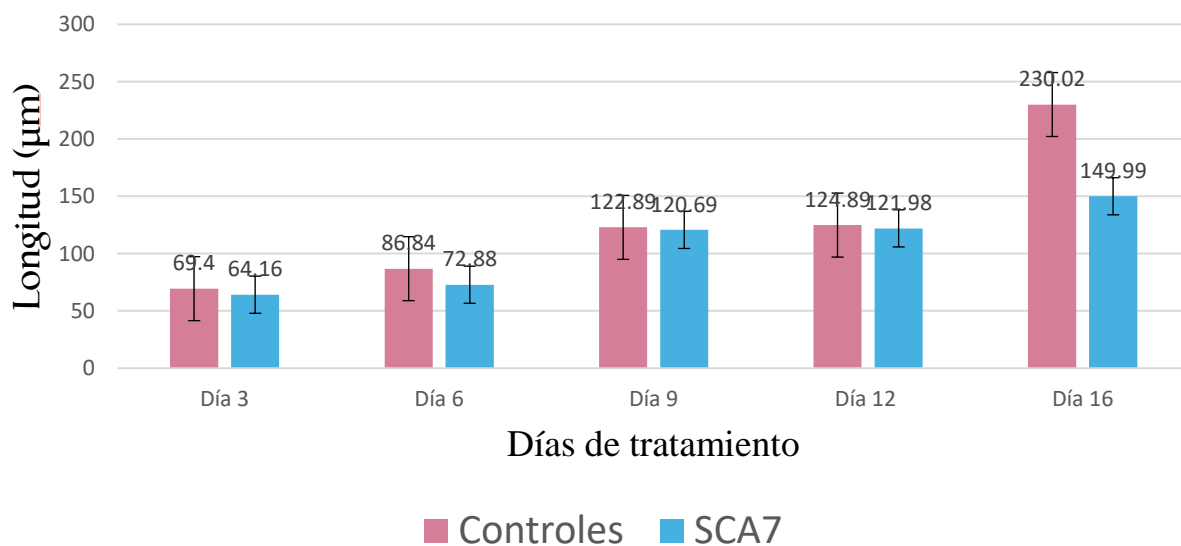


Fig. 6. Análisis morfométrico de las células diferenciadas. Cambios en las medidas del diámetro de los somas y la longitud de las dendritas, en las células de ambas condiciones que recibieron tratamiento con el coctel FICB.

2. Las células inducidas expresan el marcador neuronal TUBB3.

Las células inducidas fueron sometidas a inmunofluorescencia después de 16 días de tratamiento, para detectar la expresión del marcador neuronal B-III tubulina. La señal se mostró positiva en los fibroblastos diferenciados de ambas condiciones. En este ensayo, también fue posible observar pequeñas diferencias en cuanto a las prolongaciones presentes en las células SCA inducidas, en comparación con las células control (Fig. 7).

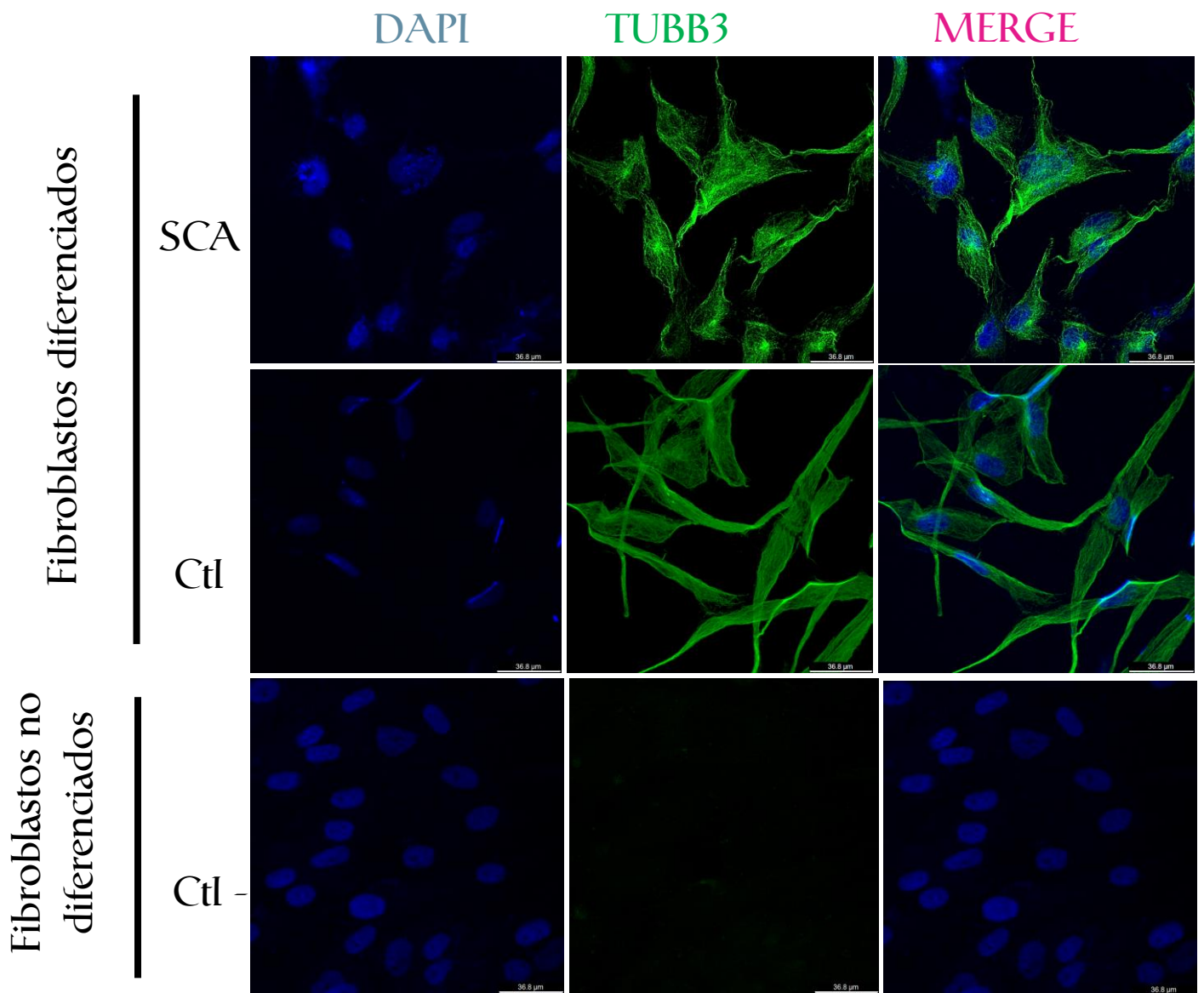


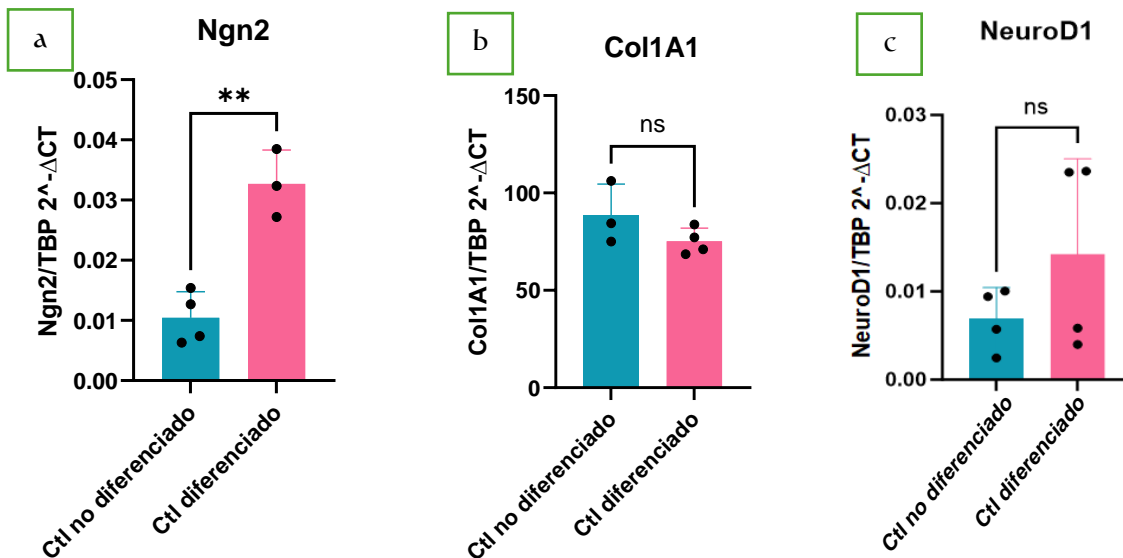
Fig. 7. Expresión de TUBB3 en las células inducidas. Se muestra la expresión de DAPI y TUBB3 en las células inducidas, y en los fibroblastos que no recibieron tratamiento.

3. Las células diferenciadas exhiben diferencias en la expresión de marcadores neurales y de fibroblasto, en comparación con los fibroblastos no tratados.

Se evaluó la expresión de diferentes marcadores relacionados con el linaje neural (NeuroD1, Ngn2), así como la expresión de Col1a1 como marcador del linaje de fibroblastos, utilizando PCR en tiempo real.

En cuanto a las células control, se observa una diferencia significativa en la expresión de Ngn2 en respuesta a la adición del tratamiento. Del mismo modo, hay una tendencia al alza en la expresión de NeuroD1, y una tendencia a la baja en la expresión de Col1A1 (Fig. 8 a, b, c).

Con respecto a las células SCA inducidas, también se observa una tendencia a la baja en la expresión de Col1A1. Sin embargo, esta tendencia a la baja también se presenta en la evaluación de Ngn2; aunque no significativa, podría representar diferencias en el proceso de inducción relacionadas con la patología (Fig. 8 d, e).



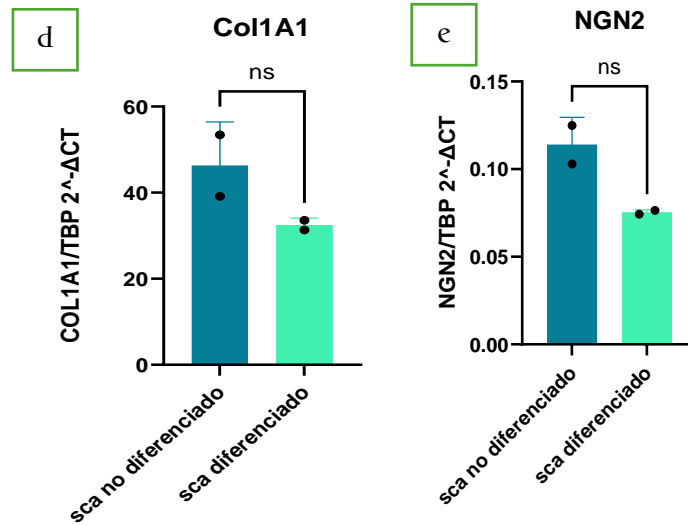


Fig. 8. Expresión de marcadores neurales y de fibroblasto. a, Ngn2 en controles no diferenciados y diferenciados. b, Col1A1 en controles no diferenciados y diferenciados. c, NeuroD1 en controles no diferenciados y diferenciados. d, Col1A1 en fibroblastos SCA7 no diferenciados y diferenciados. e, Ngn2 en fibroblastos SCA7 no diferenciados y diferenciados. P value: ** ≤ 0.01 , ns: no significativo.

4. Análisis del transcriptoma de las células inducidas mediante RNA-SEQ

4.1 Integridad de las muestras

El RNA extraído de cada condición presentó la calidad adecuada para ser enviado a secuenciación, como se demuestra por la concentración obtenida y los respectivos geles de integridad en agarosa al 1%. (Tablas 4 y 5, Fig. 9, 10).

Tabla. 4. Concentraciones de las muestras de RNA de fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN) y diferenciados (CT).

Fibroblastos controles no diferenciados (CN)		Fibroblastos controles diferenciados (CT)	
CN1	CN2	CT1	CT2

947.5 ng/ μ L	1054.6 ng/ μ L	241.1 ng/ μ L	224.8 ng/ μ L
-------------------	--------------------	-------------------	-------------------

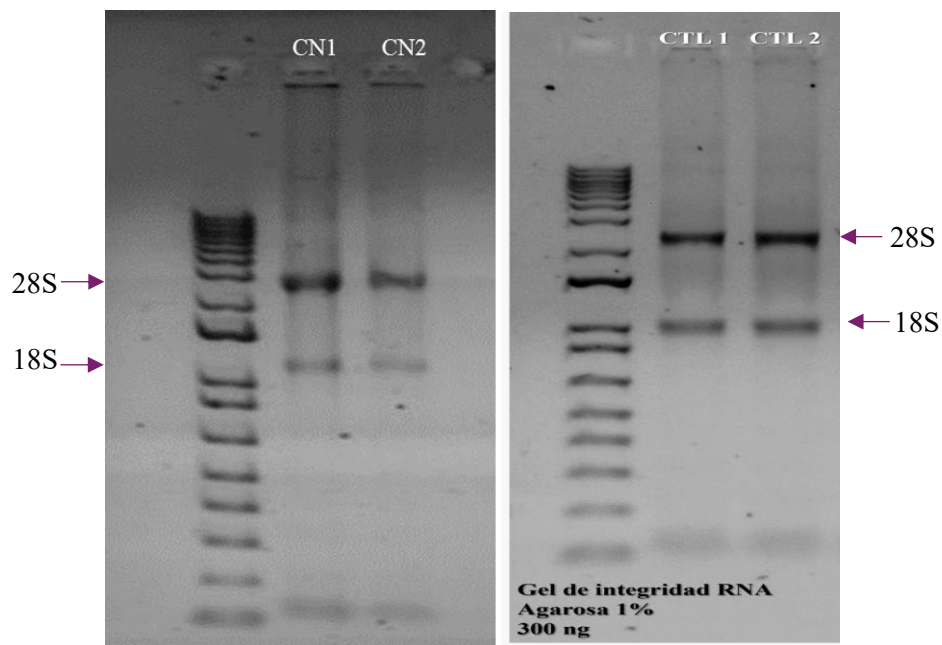


Fig. 9. Geles de integridad de RNA en agarosa 1 %. A la izquierda, se muestran las dos muestras de fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN1 y CN2); a la derecha, las muestras de fibroblastos controles sanos diferenciados (CTL1 y CTL2). Se utilizaron 300 ng de RNA.

Tabla. 5. Concentraciones de las muestras de RNA de los fibroblastos SCA7 No diferenciados (SN) y fibroblastos SCA7 diferenciados (ST).

Fibroblastos SCA7 No Diferenciados (SN)		Fibroblastos SCA7 Diferenciados (ST)	
SN1	SN2	ST1	ST2
306.3 ng/ μ L	393 ng/ μ L	333.4 ng/ μ L	375.8 ng/ μ L

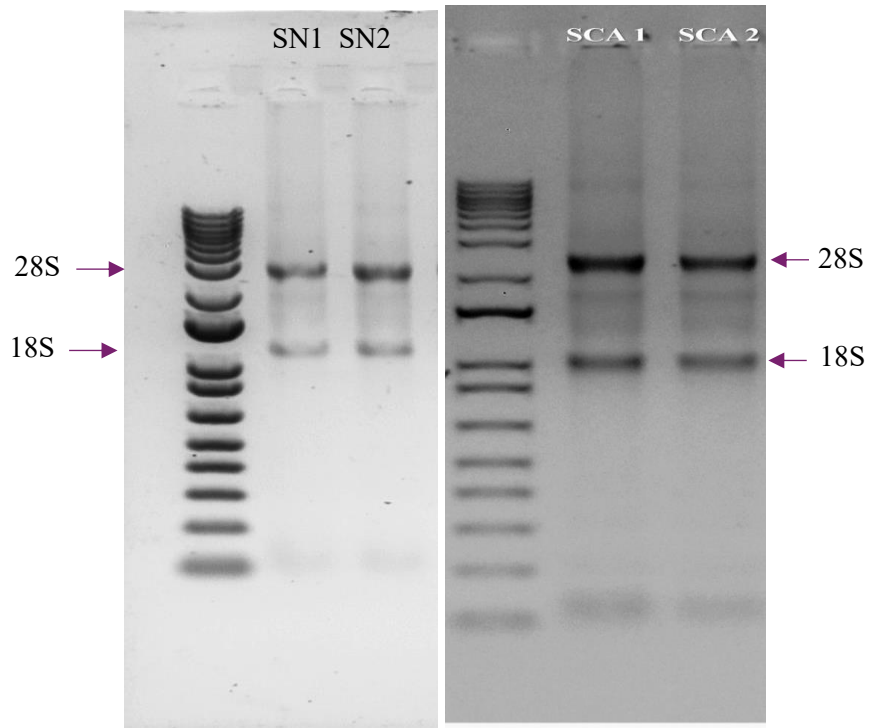


Fig. 10. Geles de integridad de RNA en agarosa 1 %. A la izquierda, se muestran las dos muestras de fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN1 y CN2); a la derecha, las muestras de fibroblastos controles sanos diferenciados (CTL1 y CTL2). Se utilizaron 300 ng de RNA.

4.2 PCA de las muestras analizadas

El análisis de componentes principales proyecta el nivel de varianza entre las muestras analizadas. En este caso, se observa que las muestras no tratadas, tanto de controles sanos como de SCA7, se agrupan de forma distinta a las células inducidas. Del mismo modo, muestra que hay poca variación entre los duplicados de las muestras analizadas (Fig. 11).

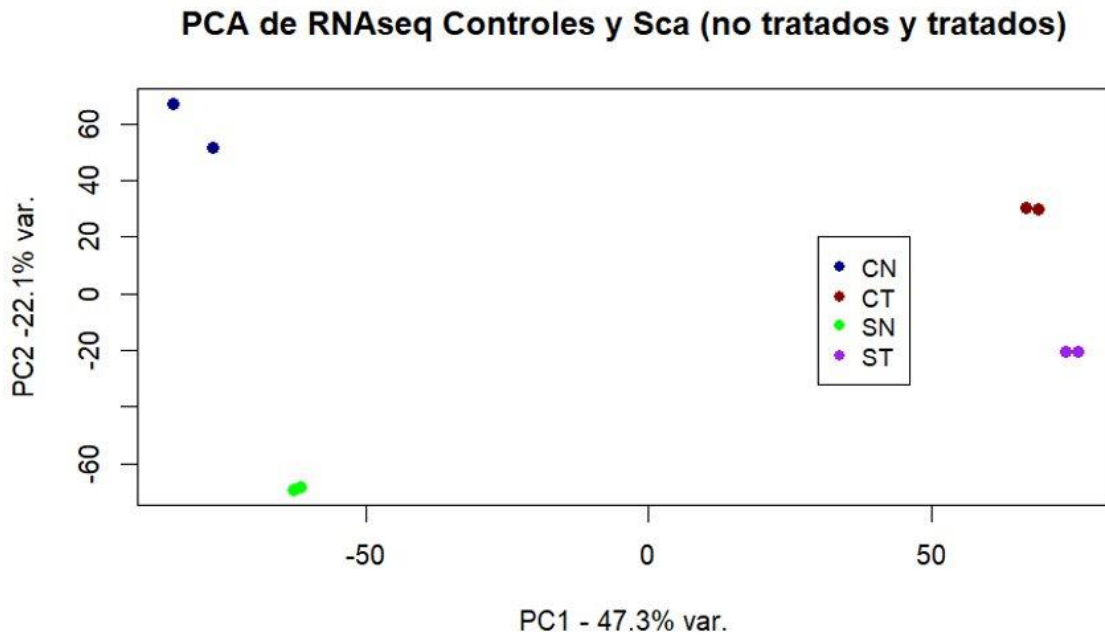


Fig. 11. PCA de las muestras analizadas. En azul y en verde, se muestran los duplicados de controles sanos y SCA7 no tratados, respectivamente; en rojo y morado, se muestran los duplicados de controles sanos y SCA7 tratados, respectivamente.

4.3 Perfil transcripcional de los fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN) en comparación con los fibroblastos sanos diferenciados (CT).

Al comparar el perfil de los fibroblastos controles sanos no diferenciados (CN) y los fibroblastos sanos diferenciados (CT). Se reconocieron 1739 genes diferencialmente expresados a la baja, y 2212 expresados al alza (Fig. 12).

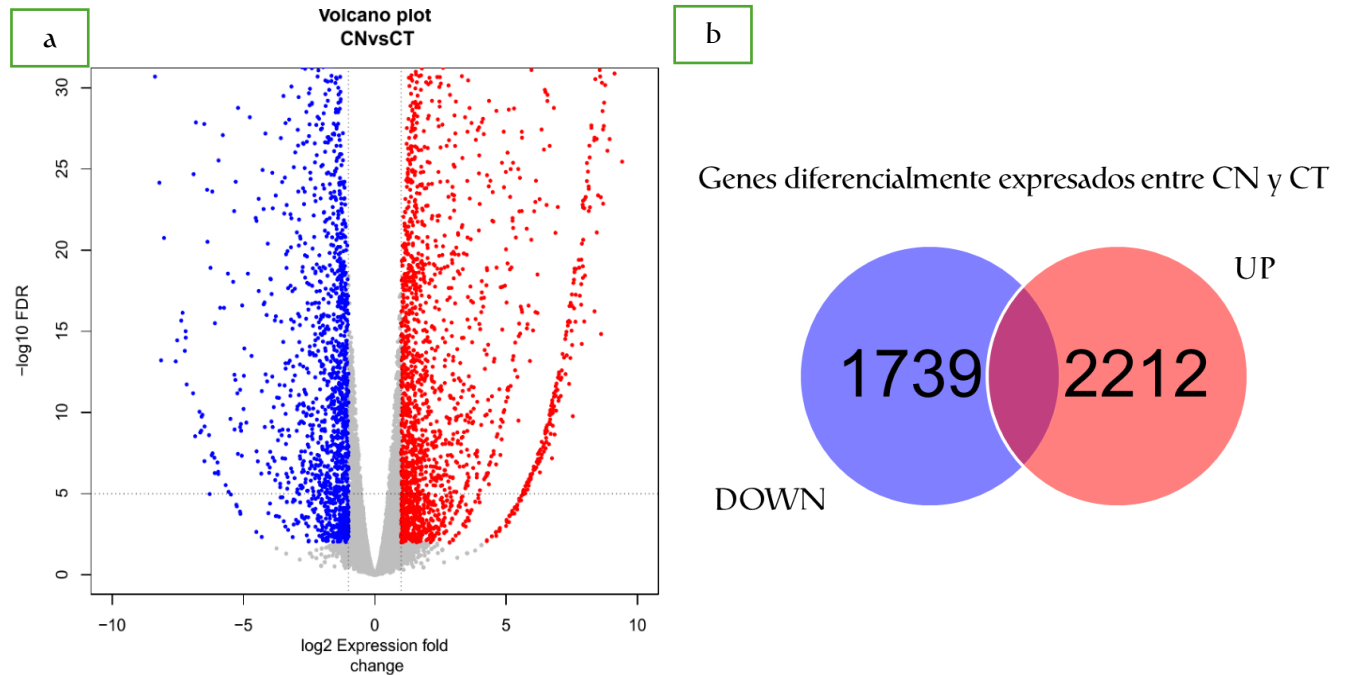


Fig. 12. Genes diferencialmente expresados entre controles sanos no diferenciados (CN) y diferenciados (CT). a, Volcano plot con la distribución de los genes diferencialmente expresados, siendo los rojos aquellos que se expresan a la alza, y los azules los que se muestran a la baja. b, diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados entre CN y CT.

Se analizó el perfil funcional de los genes diferencialmente expresados a la alza con el sitio web ShinyGo. En este sentido, se encontró que las vías mayormente representadas son vías relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso, diferenciación neuronal, y regulación del desarrollo de proyecciones neurales (Fig. 13).

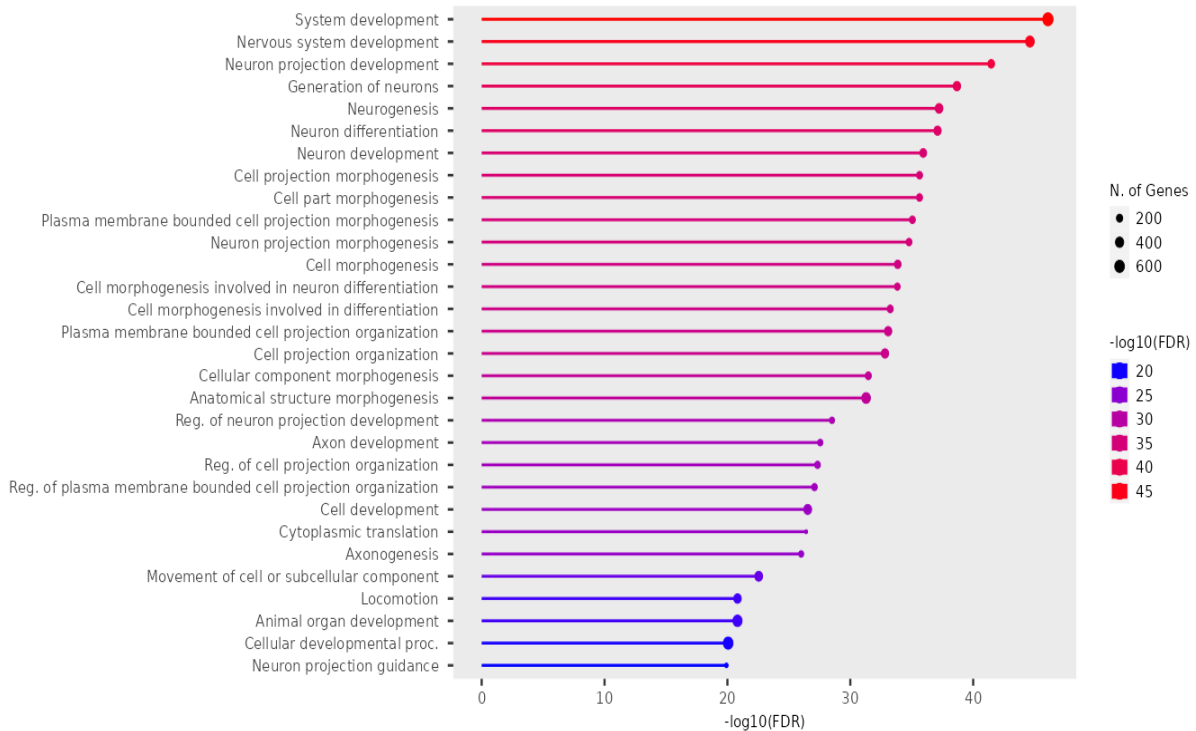


Fig. 13. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la alza. Muestra las 30 vías con mayor representación, ordenadas con respecto a la medida estadística $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Estos cambios se ven reflejados en el perfil que muestran los mapas de calor, o heatmaps, en donde se comparan los estados del transcriptoma respecto a los genes involucrados en el desarrollo del sistema nervioso. Como se observa en este gráfico, existe una tendencia clara en la sobrerrepresentación de estos genes. Particularmente, destacan los genes TUBB3, NEFH y MAP2, expresados a la alza en la condición que recibió el tratamiento con el coctel FICB (Fig. 14).

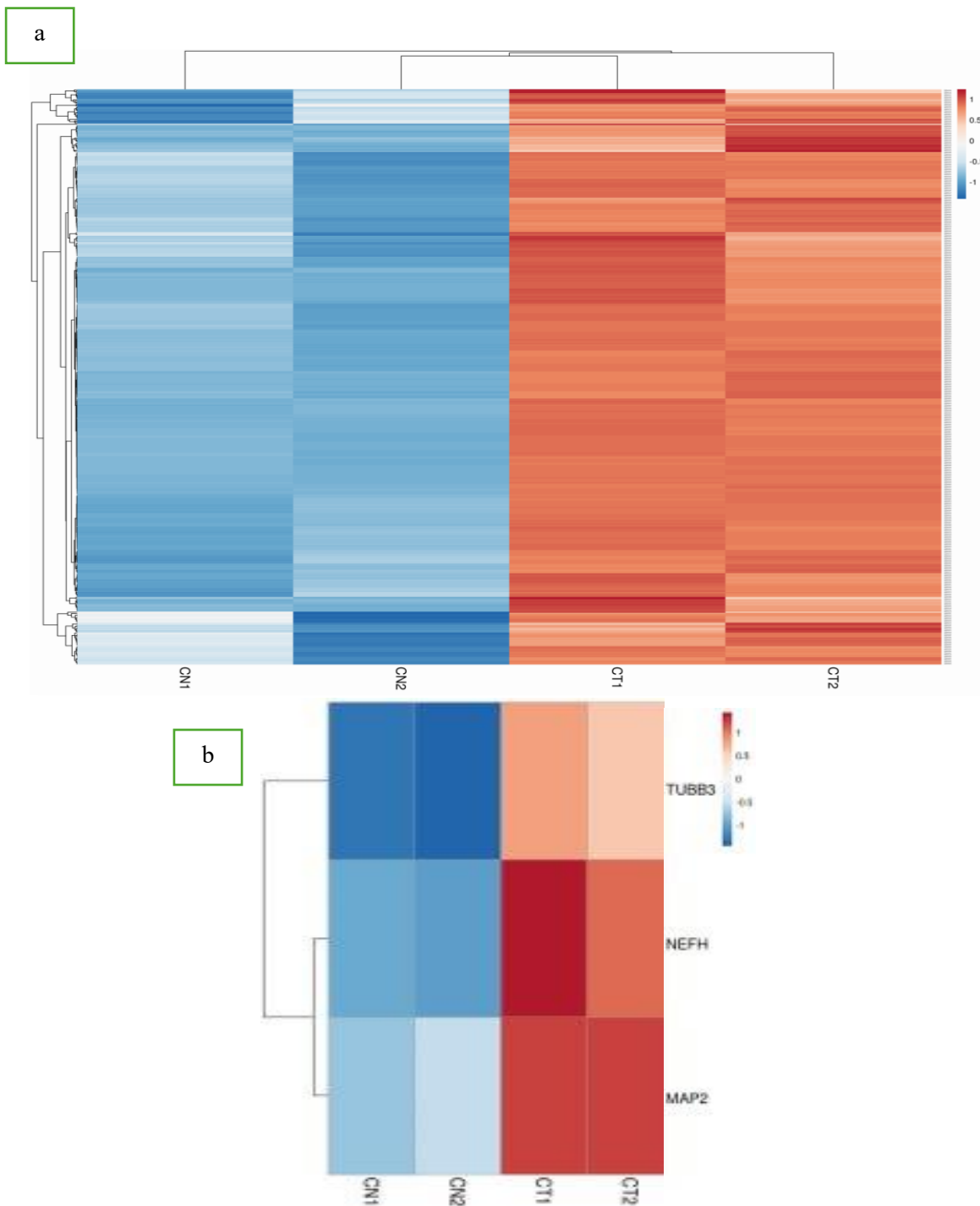


Fig. 14. Heatmap de los genes diferencialmente expresados entre controles no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la alza. a, heatmap los genes que participan en la vía de desarrollo del sistema nervioso, arrojada en el análisis de ontología. b, acercamiento a genes neurales de importancia: TUBB3, NEFH y MAP2. En azul, se representan expresiones bajas; en rojo, expresiones altas.

Por otra parte, se realizó un análisis de agrupación de anotaciones funcionales (*Functional Annotation Clustering*), que identifica grupos de transcritos correlacionados, y las vías funcionales que representan. En este análisis se observó que destaca el *cluster 1*, con un puntaje de enriquecimiento de 23.48 %, en donde los términos encontrados tienen relación con unión a DNA, así como factores de transcripción (Fig. 15).

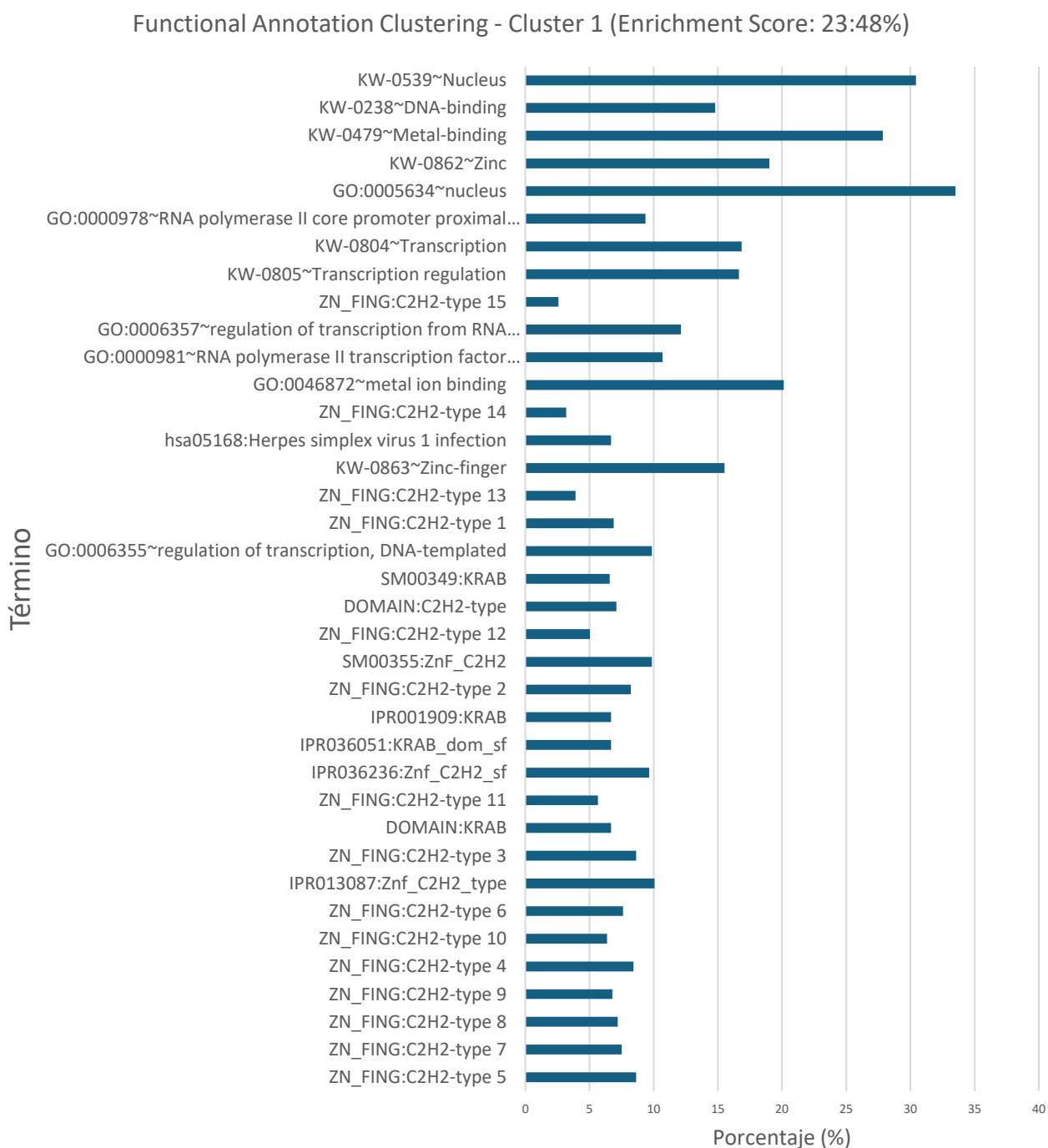
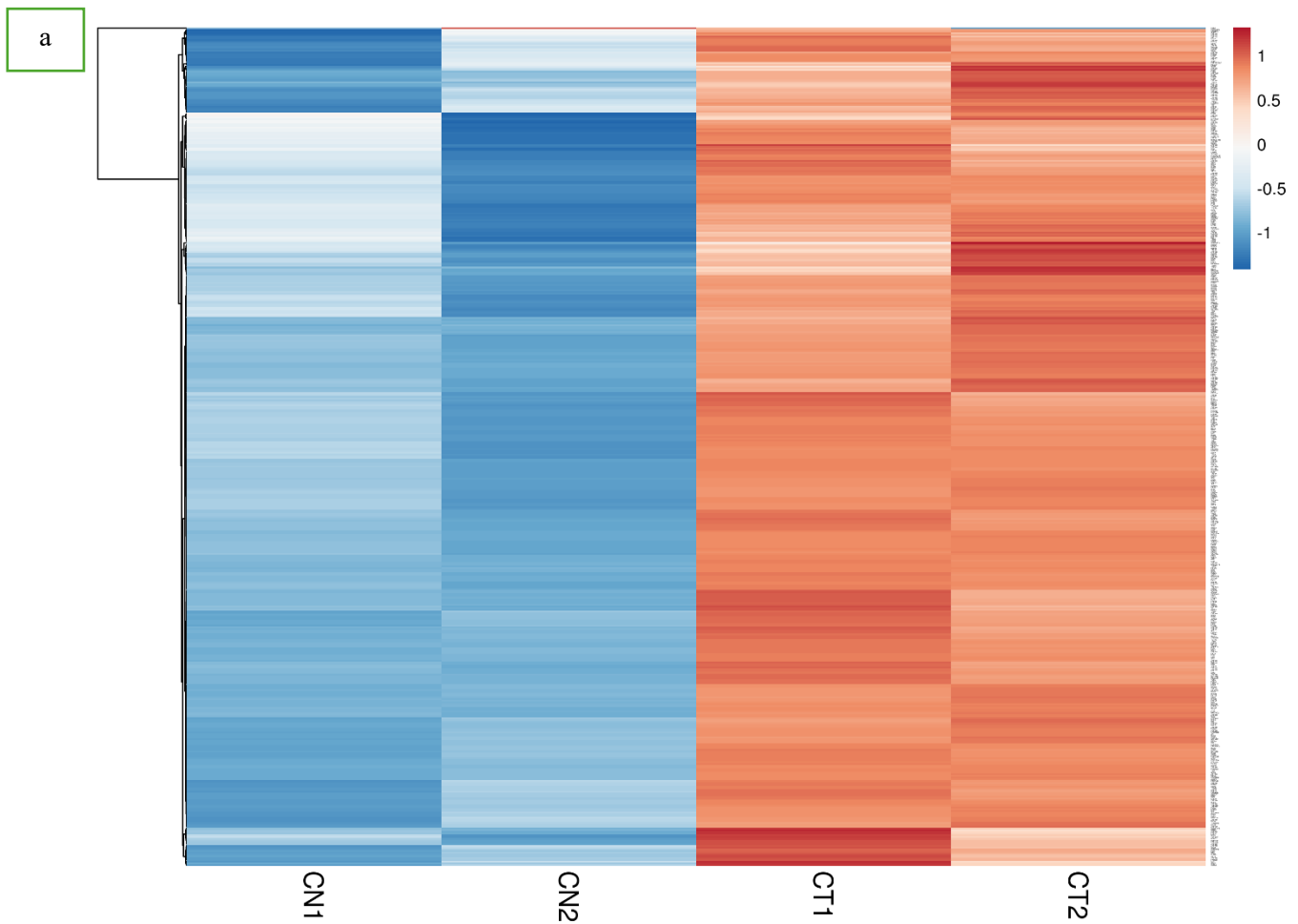


Fig. 15. *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT). Se eligió el *cluster 1* por ser aquel que muestra el mayor porcentaje de enriquecimiento (23.48%). Los términos agrupados se grafican de acuerdo a la cantidad de genes que representan.

Entre estos transcritos, se encuentran factores de transcripción relacionados con el desarrollo neural, tales como CREB5, HOXA3 y PRRX1, así como miembros de la familia de transcritos que dan lugar a proteínas de dedos de zinc (Fig. 16).



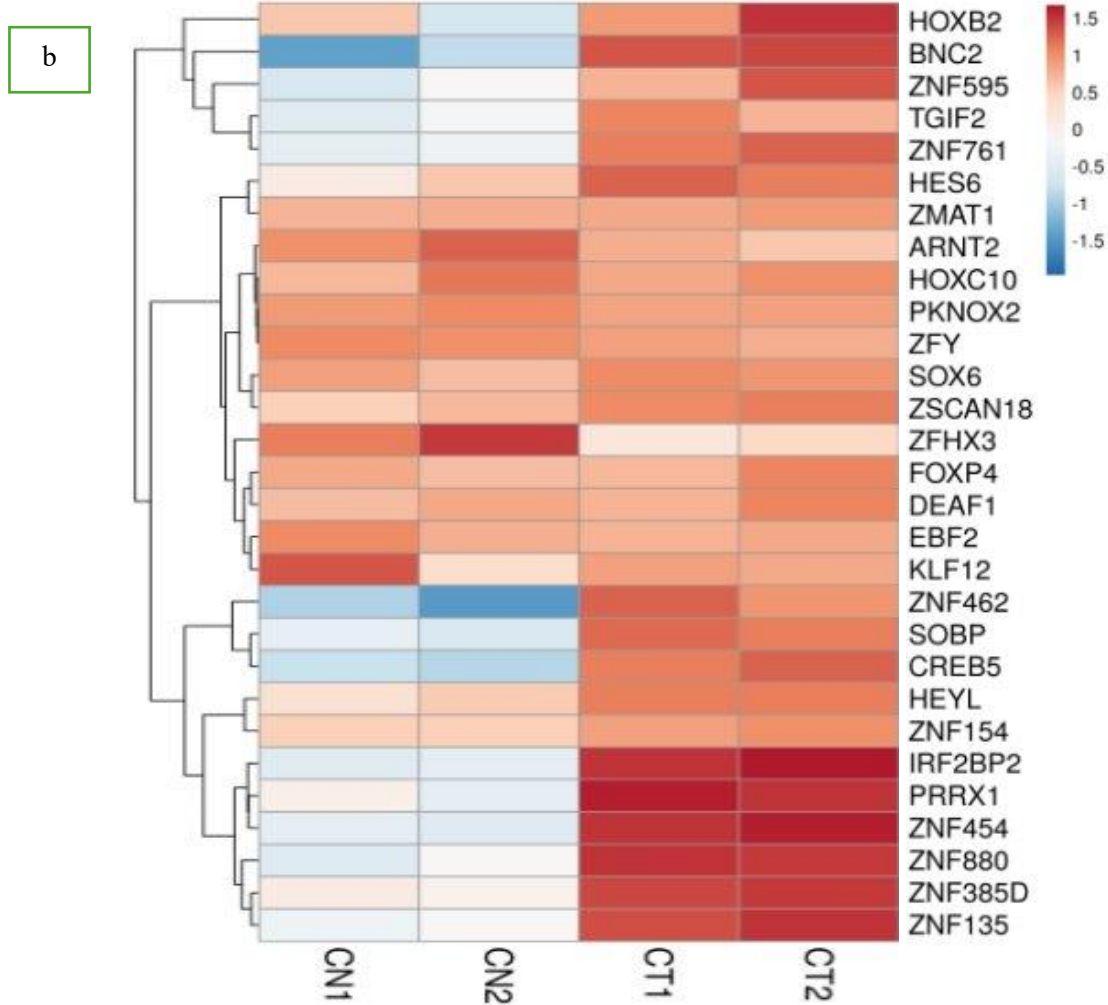


Fig. 16. Heatmap del Cluster 1 del Functional Annotation Cluster; comparación CN vs CT a la alza. a, Heatmap total del cluster 1. b, Heatmap de acercamiento a factores de transcripción relacionados con el desarrollo neural.

En cuanto a las vías representadas a la baja, destacan aquellas con relación a la morfogénesis de la estructura anatómica, organización del citoesqueleto, y el movimiento de los componentes subcelulares (Fig. 17).

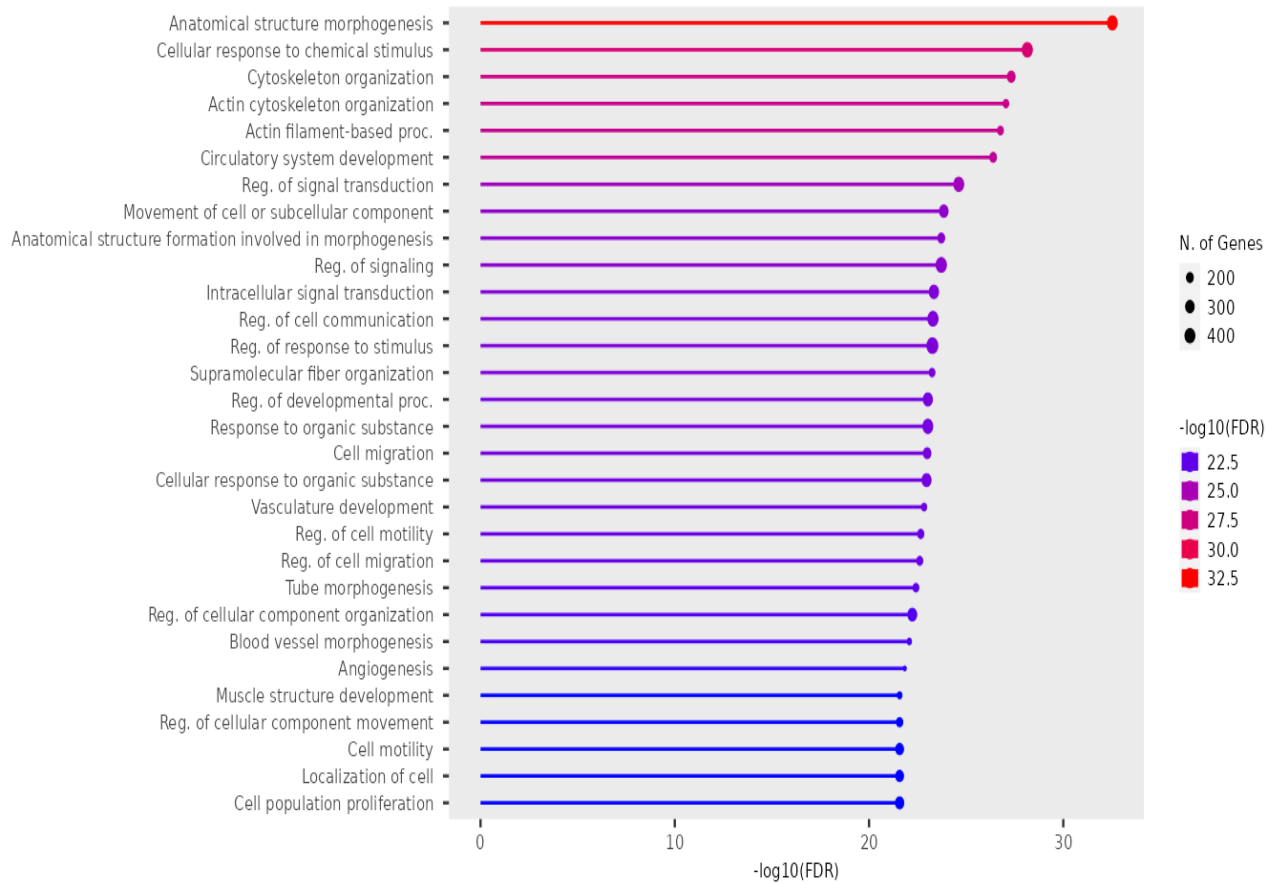


Fig. 17. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la baja. Muestra las 30 vías con mayor representación, ordenadas con respecto a la medida estadística $-\log_{10}(\text{FDR})$.

El mapa de calor de la función biológica de morfogénesis estructural anatómica, muestra los cambios en el perfil transcripcional de las células no inducidas, en contraste con aquellas que sí recibieron el tratamiento, siendo la expresión en las células no inducidas significativamente más baja (Fig. 18).

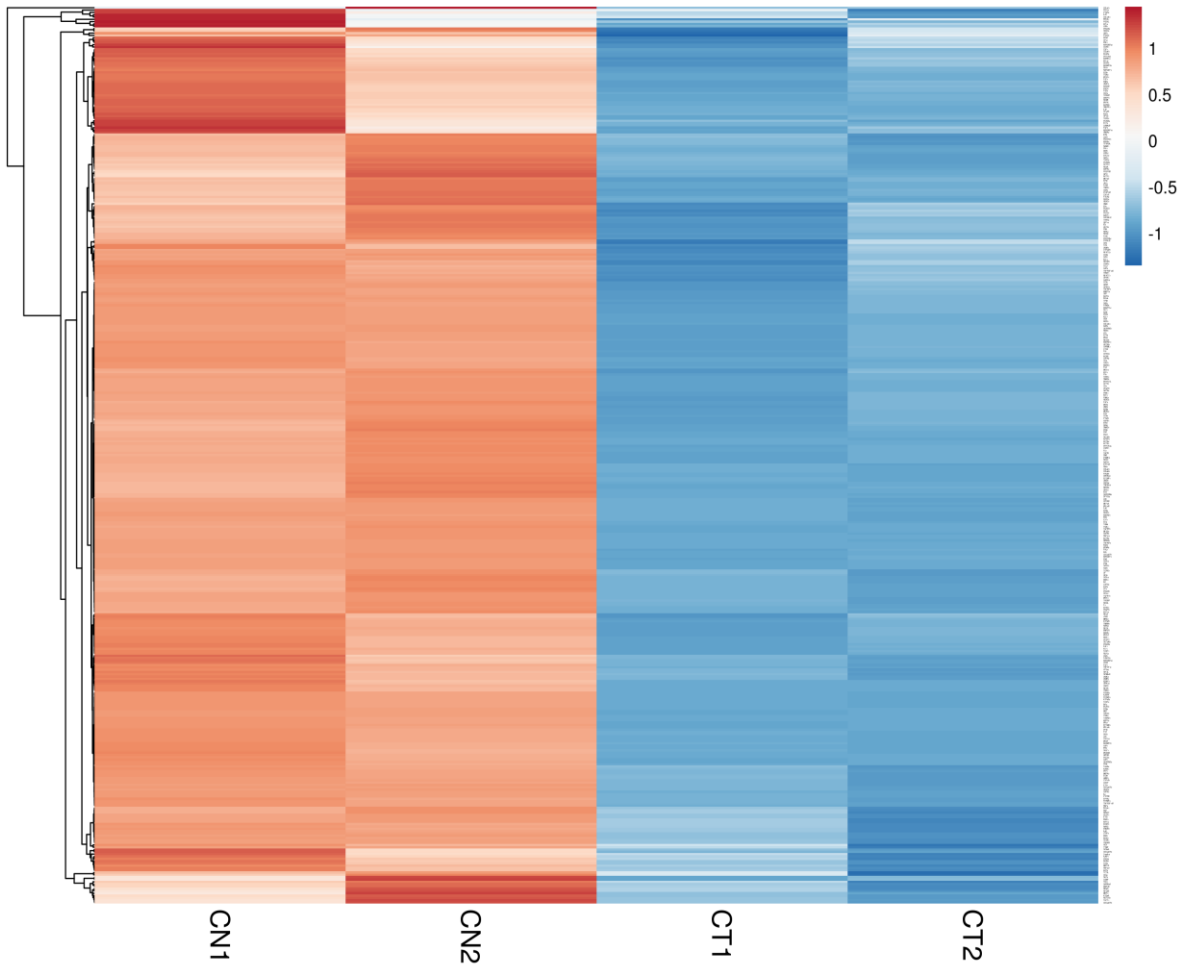


Fig. 18. Heatmap de los genes diferencialmente expresados entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT) a la baja. Se muestran los genes que participan en la vía de regulación de la morfogénesis anatómica, arrojada en el análisis de ontología.

Al igual que con los transcritos encontrados expresados diferencialmente a la alza, se realizó un análisis de agrupación. Aquí, destacó el *cluster* 1, con un puntaje de enriquecimiento de 12.85%, que mostró como los grupos más representados aquellos con relación a la unión a filamentos de actina, y citoesqueleto (Fig 19).

Functional Annotation Cluster (Enrichment score: 12.85%)

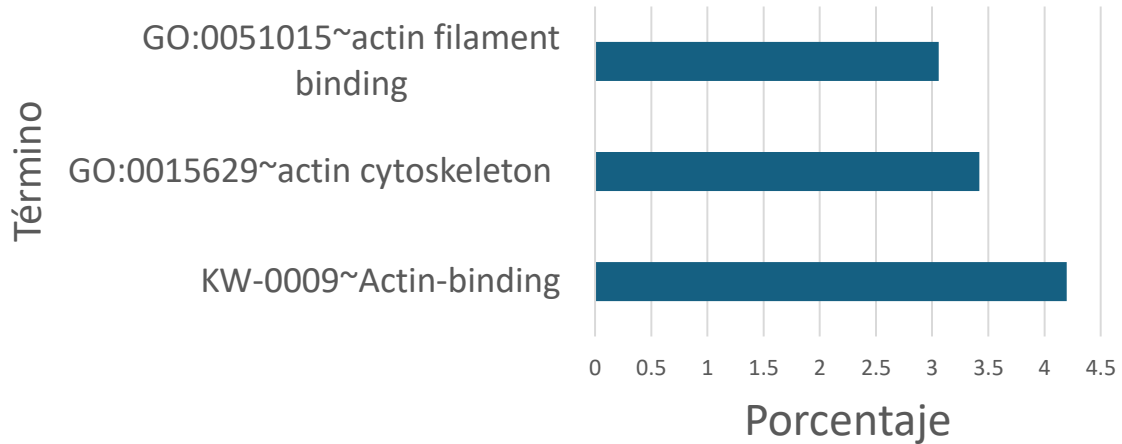


Fig. 19. Functional Annotation Clustering de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos no tratados (CN) y controles sanos tratados (CT). Se eligió el cluster 1 por ser aquel que muestra el mayor porcentaje de enriquecimiento (12.85%). Los términos agrupados se grafican de acuerdo a la cantidad de genes que representan.

Un mapa de calor de este cluster (Fig. 20), muestra de forma gráfica los cambios en la representación de estos transcritos. Entre ellos, destacan VASP, SYNPO2, NEXN, y AHNAK, por ser factores que guardan relación la estructura y motilidad de los fibroblastos.

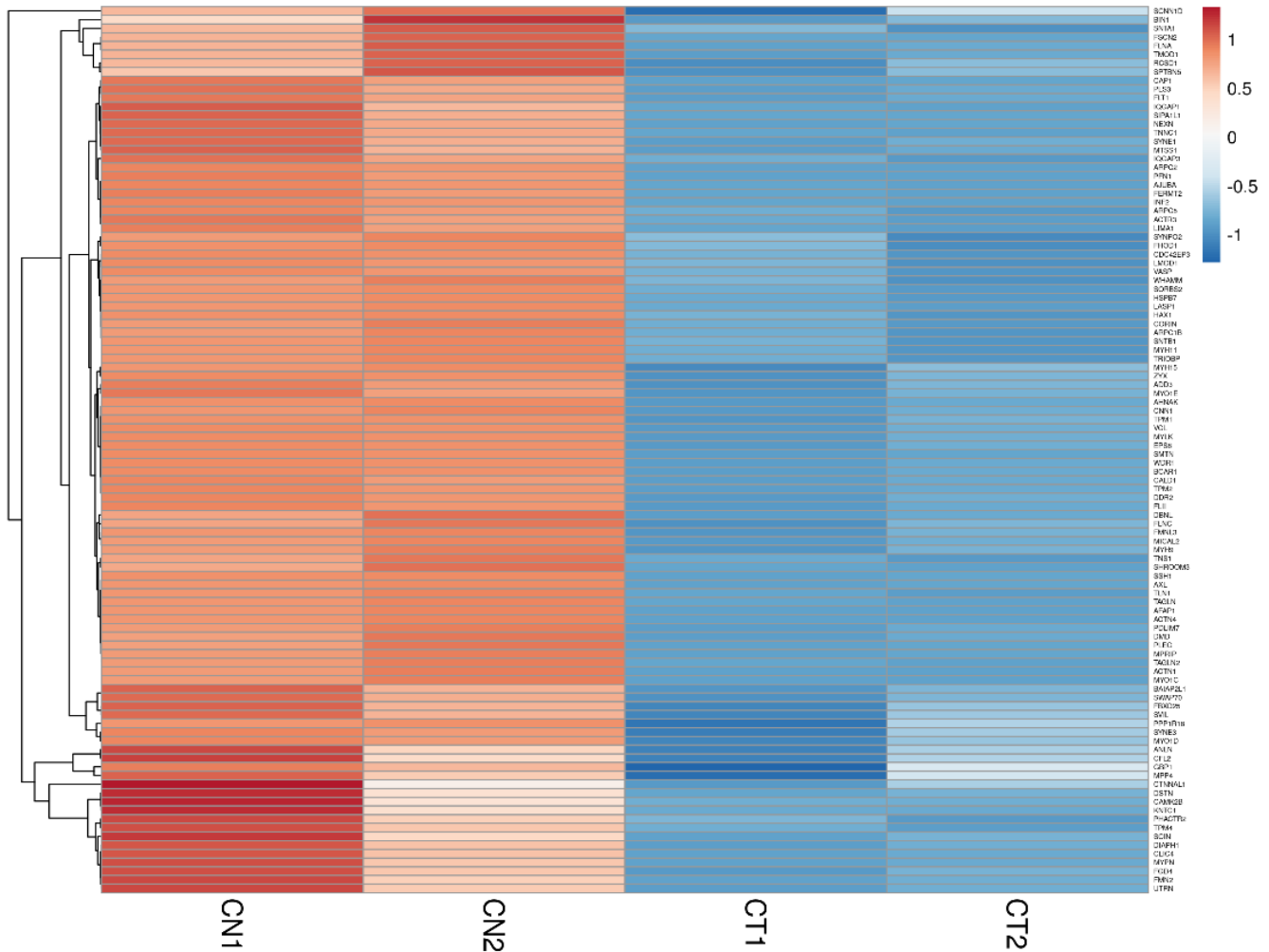


Fig. 20. Heatmap del Cluster 1 del Functional Annotation Cluster; comparación CN vs CT a la baja. Se muestran todos los genes agrupados en el cluster 1 del análisis de anotación fnucional.

4.4 Perfil transcripcional de los fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) en comparación con los fibroblastos SCA7 diferenciados (ST).

Una vez establecido que el perfil transcripcional en los controles cambia de forma favorable, el siguiente paso consistió en verificar que las células SCA7 también pasan por un cambio de linaje hacia el tipo neural.

Al comparar el transcriptoma de las células SCA7 no diferenciadas (SN) con las células SCA7 (ST) que sí recibieron el tratamiento con el coctel FICB, se encuentra en primera

instancia que existen 1556 genes diferencialmente expresados a la baja, y 1667 genes diferencialmente expresados a la alza (Fig. 21).

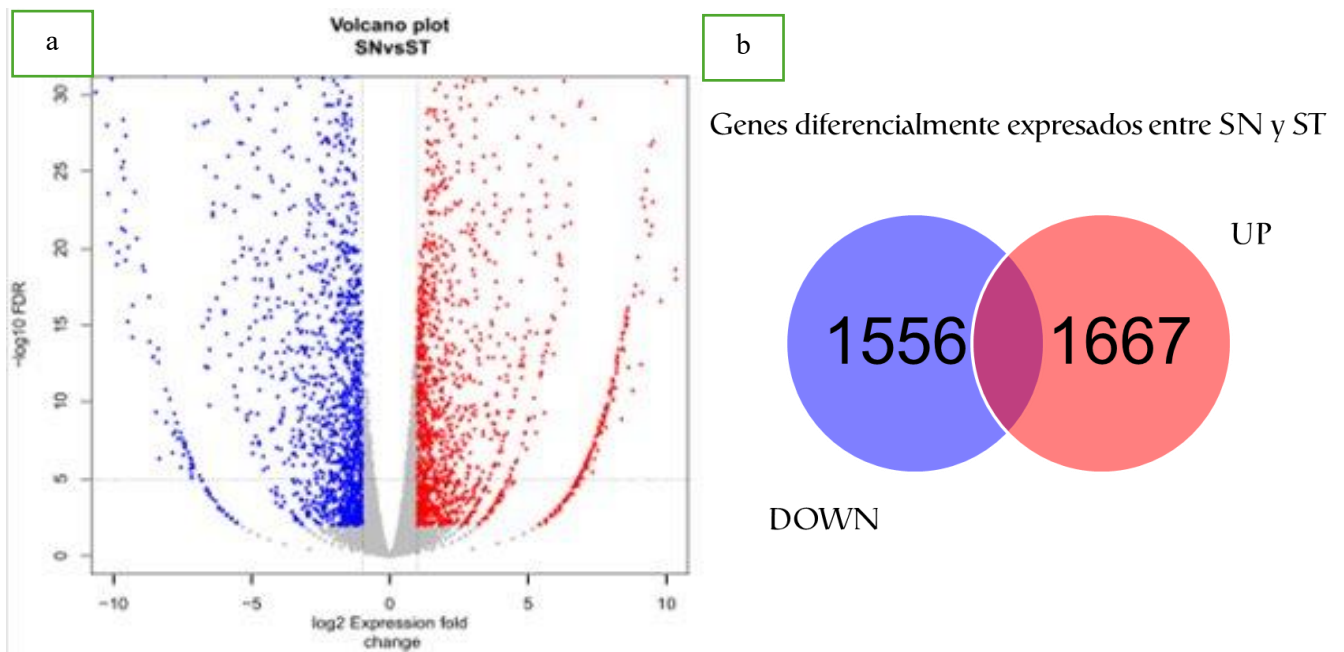


Fig. 21. Genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) y diferenciados (ST). a, Volcano plot con la distribución de los genes diferencialmente expresados, siendo los rojos aquellos que se expresan a la alza, y los azules los que se muestran a la baja. b, diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados entre CN y CT.

Al igual que con las condiciones de controles sanos, se realizó un análisis de ontología y función biológica en el que se observó que, a la alza, se encuentran sobrerrepresentadas vías con relación al desarrollo del sistema nervioso, diferenciación neural y neurogénesis (Fig. 22).

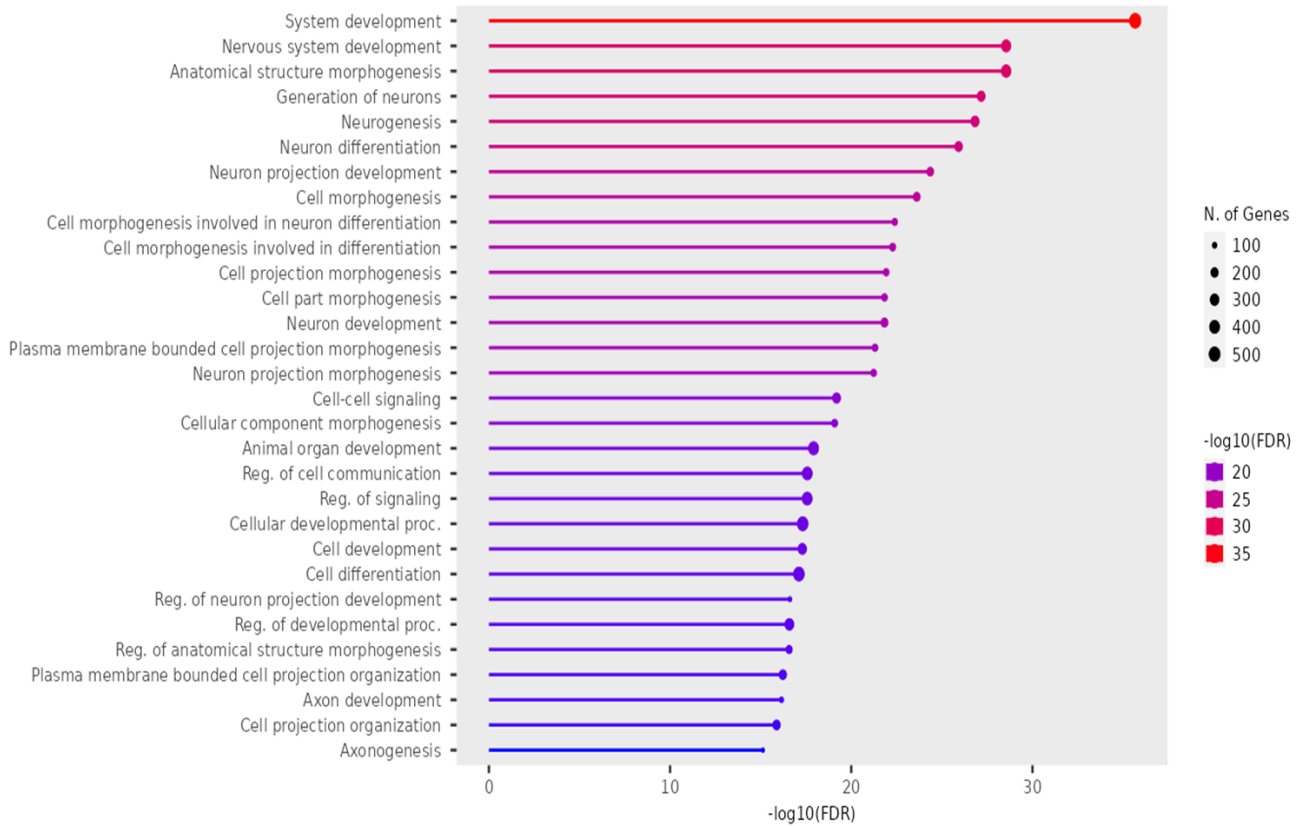


Fig. 22. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) y fibroblastos SCA7 diferenciados (ST) a la alza. Muestra las 30 vías con mayor representación, ordenadas con respecto a la medida estadística $-\log_{10}(\text{FDR})$.

Estos cambios se ven reflejados en la expresión aumentada que muestran los heatmaps de los genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso entre estas dos condiciones (SN y ST). De forma similar a lo observado en la diferenciación de los controles sanos, destaca la presencia de factores neurales importantes como TUBB3, NEFH y MAP2 (Fig. 23).

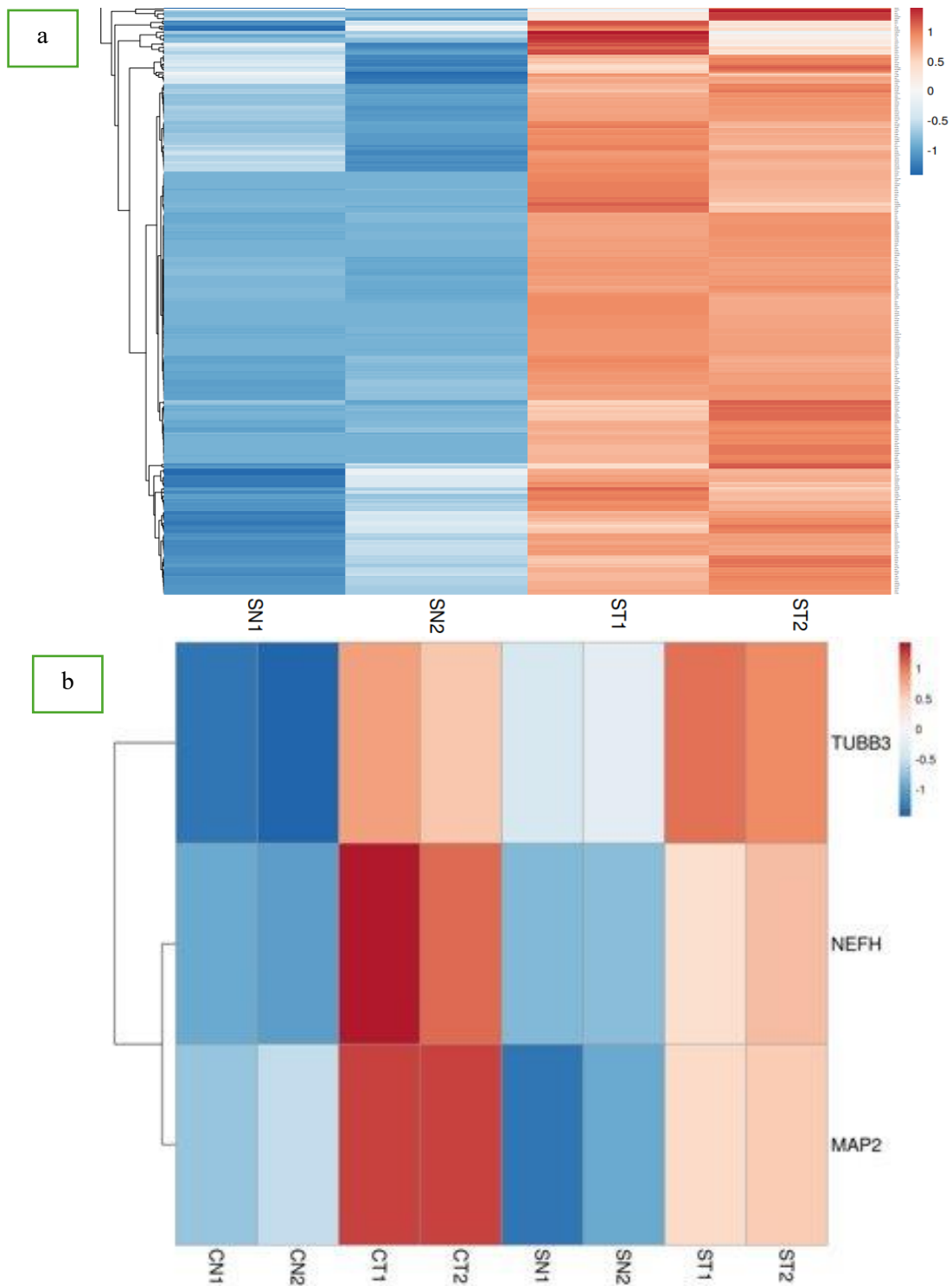
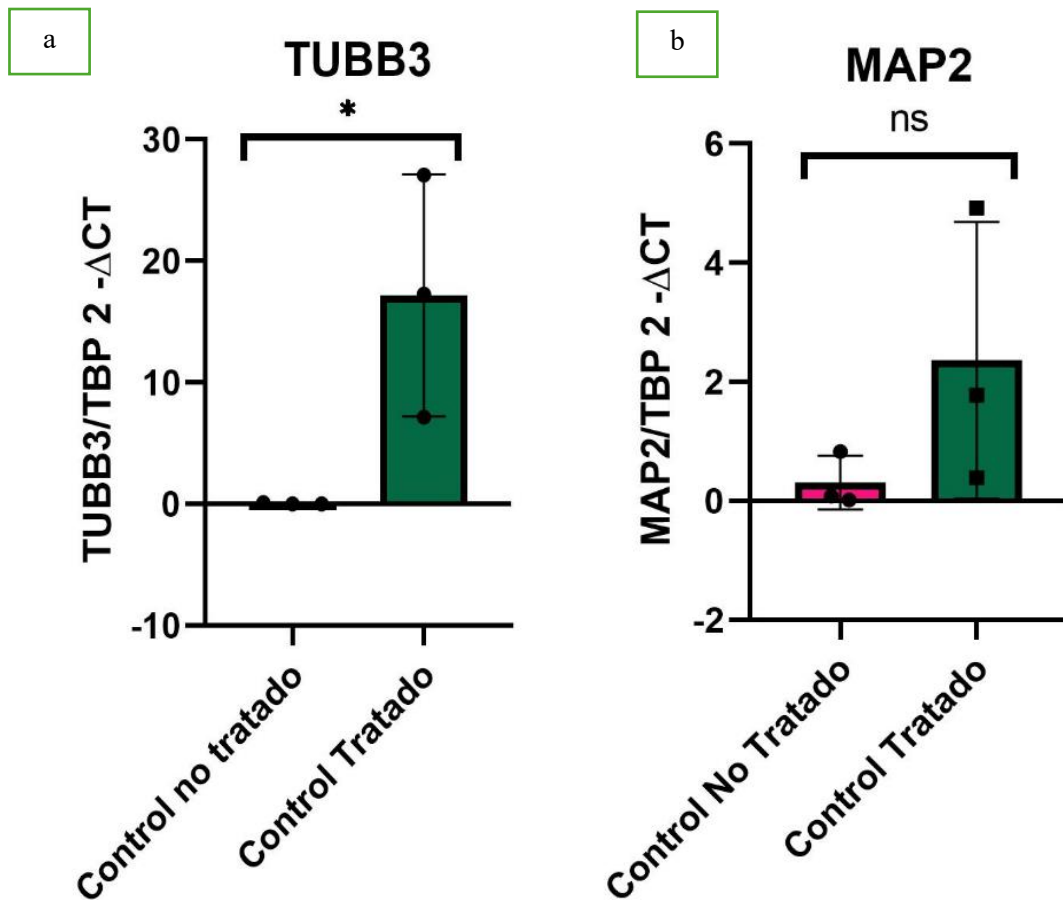


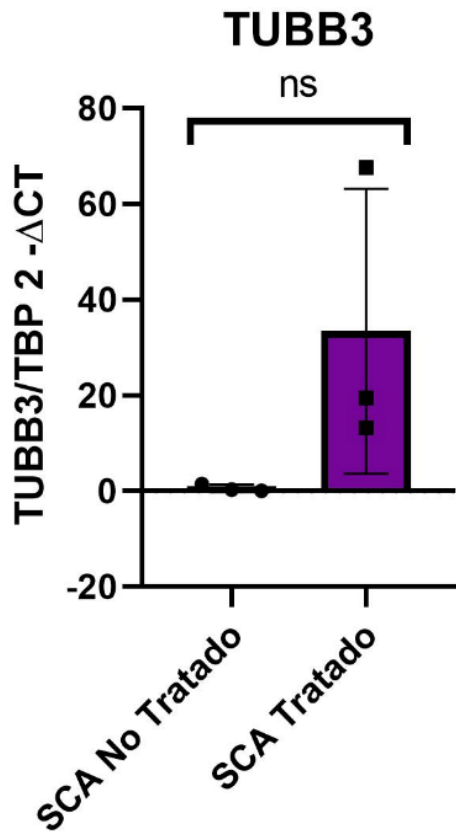
Fig. 23. Heatmap de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) y tratados (ST) a la alza. a, heatmap los genes que participan en la vía de desarrollo del sistema nervioso, arrojada en el análisis de ontología. b, acercamiento a genes neurales de importancia: TUBB3, NEFH y MAP2. Se incluye la comparación con el perfil de expresión de los

fibroblastos controles sanos tratados. En azul, se representan expresiones bajas; en rojo, expresiones altas.

La expresión de estos factores también fue corroborada mediante PCR en tiempo real. Se observó que los fibroblastos que recibieron el coctel FICB, muestran aumentos significativos en la expresión de TUBB3, NEFH y MAP2, tanto en fibroblastos controles sanos como en fibroblastos con SCA7, en comparación con aquellos que no recibieron el tratamiento (Fig. 24).



c



d

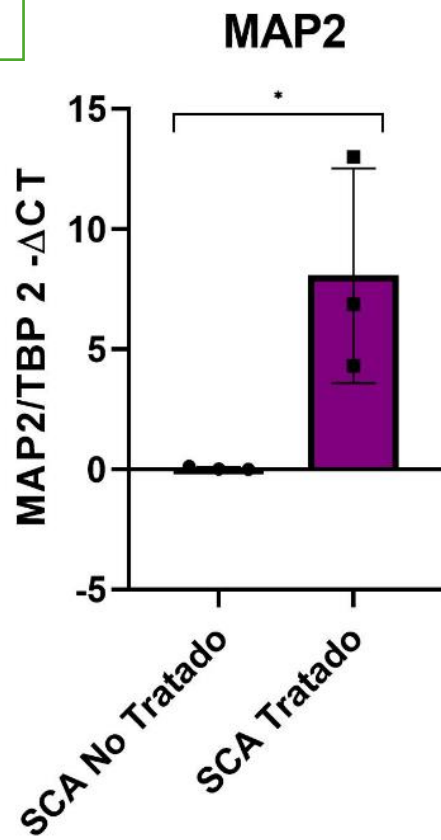


Fig. 24. Expresión de los marcadores neurales TUBB3 y MAP2. a, Expresión de TUBB3 entre controles sanos no tratados y tratados. b, Expresión de MAP2 entre controles sanos no tratados y tratados. c, Expresión de TUBB3 entre fibroblastos SCA7 no tratados y tratados. d, Expresión de MAP2 entre fibroblastos SCA7 no tratados y tratados. P value: * $p \leq 0.05$, ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001 , ns: no significativo.

El análisis de *Functional Annotation Clustering*, resaltó al *cluster 1*, con un puntaje de enriquecimiento de 17.33 %. En este grupo, se destacan términos de factores relacionados con uniones disulfuro y glicoproteínas (Fig. 25). El mapa de calor de estos transcritos muestra el cambio positivo en la representación que exhiben las células no tratadas, con respecto a aquellas que recibieron el coctel FICB (Fig. 26)

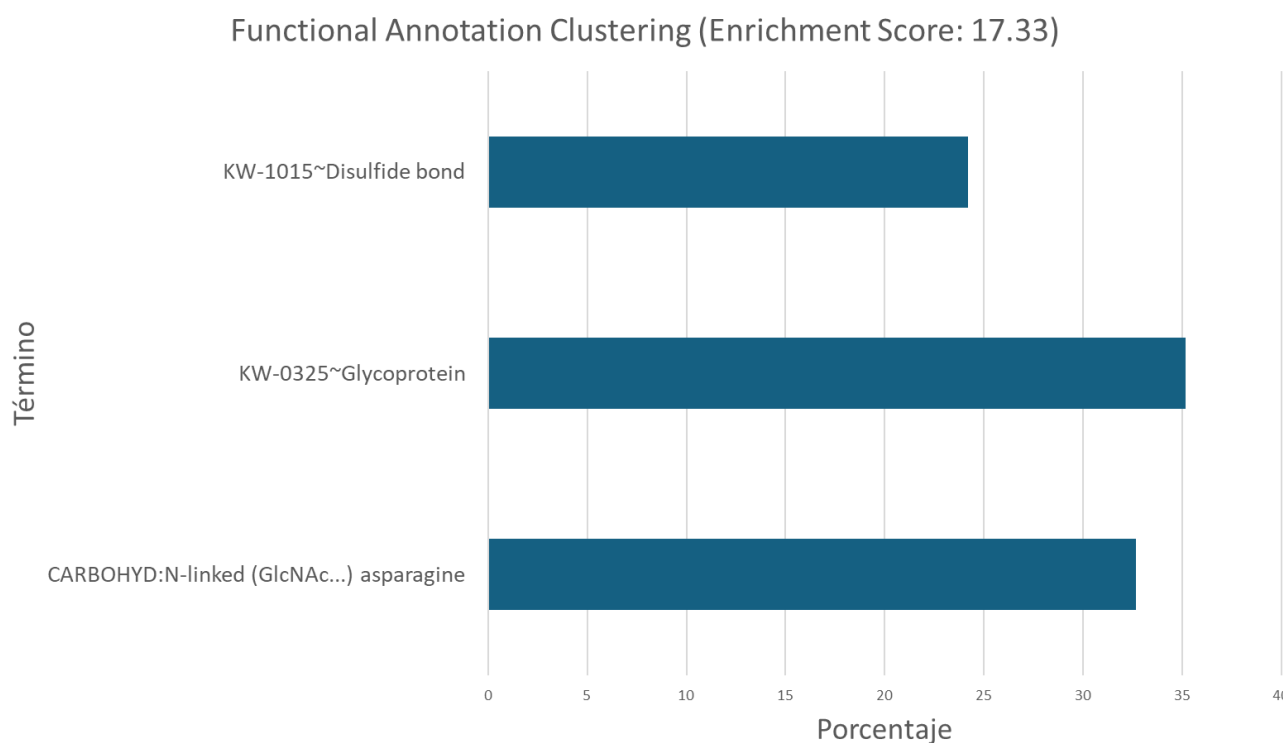


Fig. 25. *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la alza entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST). Se eligió el *cluster 1* por ser aquel que muestra el mayor porcentaje de enriquecimiento (17.33%). Los términos agrupados se grafican de acuerdo a la cantidad de genes que representan.

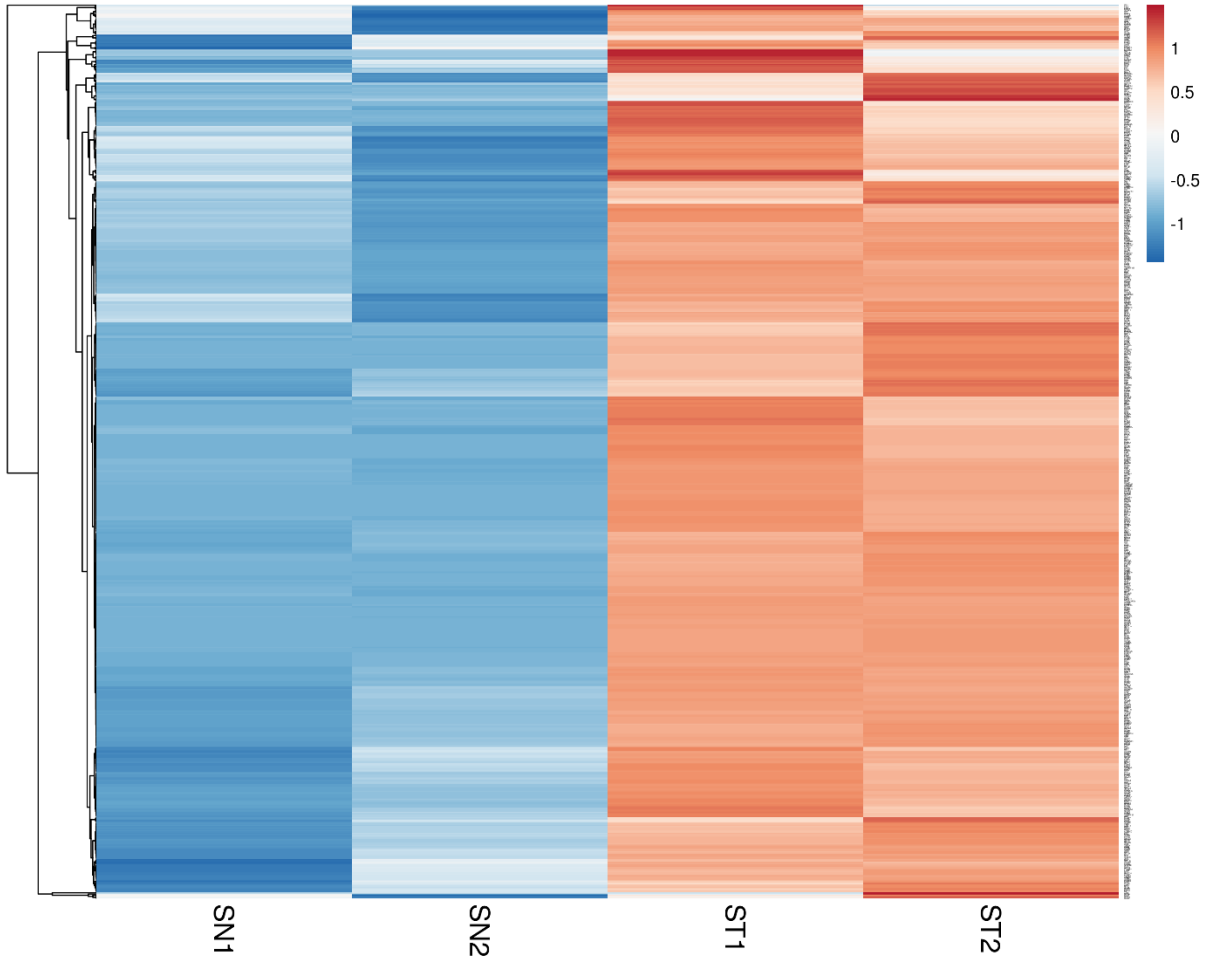


Fig. 26. Heatmap del *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la alza entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST). Se muestran todos los genes agrupados en el cluster 1 del análisis de anotación funcional.

Para evaluar los cambios referentes a la expresión a la baja entre las condiciones no tratadas y tratadas de los fibroblastos con SCA7, también se realizó un análisis de ontología de función biológica. Entre estos términos, se encuentran aquellos relacionados con la regulación del ciclo celular y replicación de DNA (Fig. 27). El mapa de calor del término más representado (Procesamiento del ciclo celular), muestra cómo las células inducidas exhiben menores expresiones en estos genes, en comparación con las células no inducidas (Fig. 28).

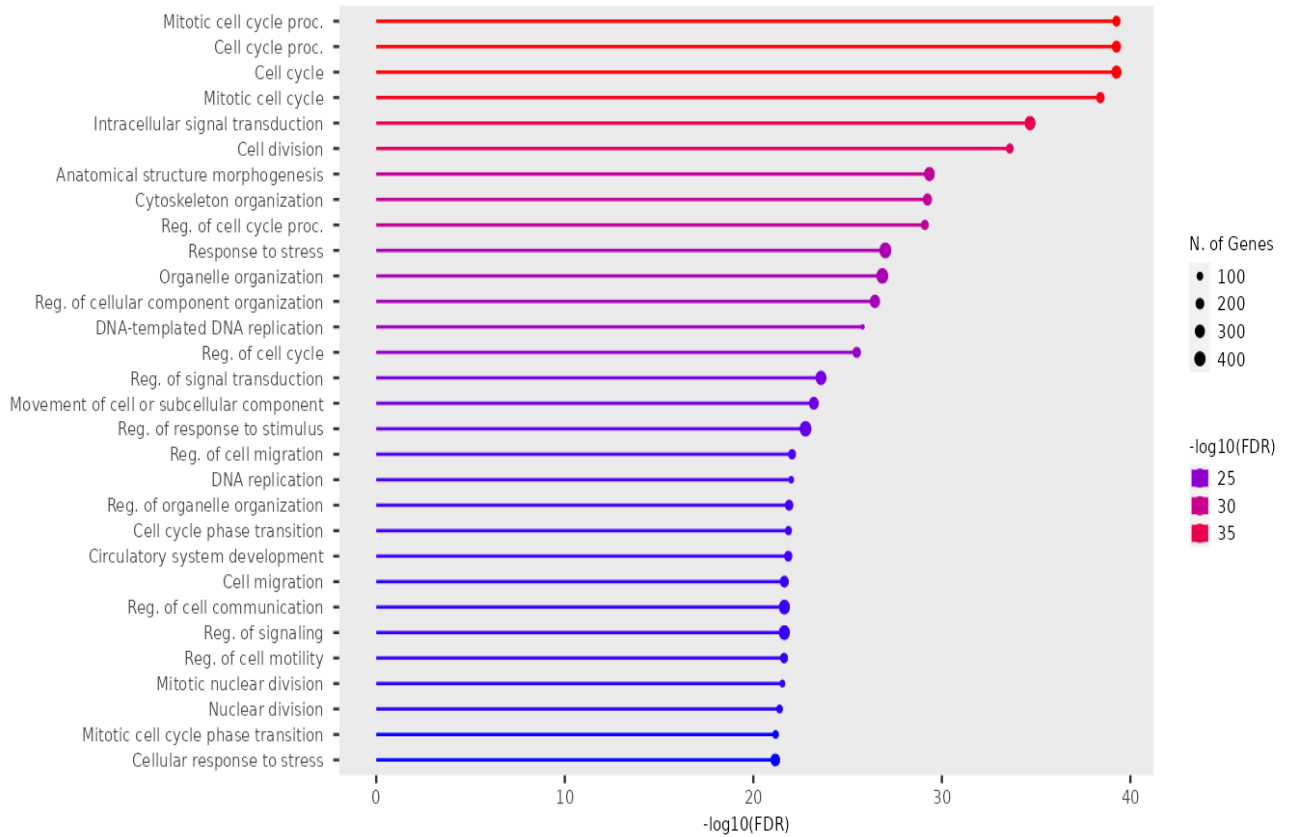


Fig. 27 Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no diferenciados (SN) y fibroblastos SCA7 diferenciados (ST) a la baja. Muestra las 30 vías con mayor representación, ordenadas con respecto a la medida estadística $-\log_{10}(\text{FDR})$.

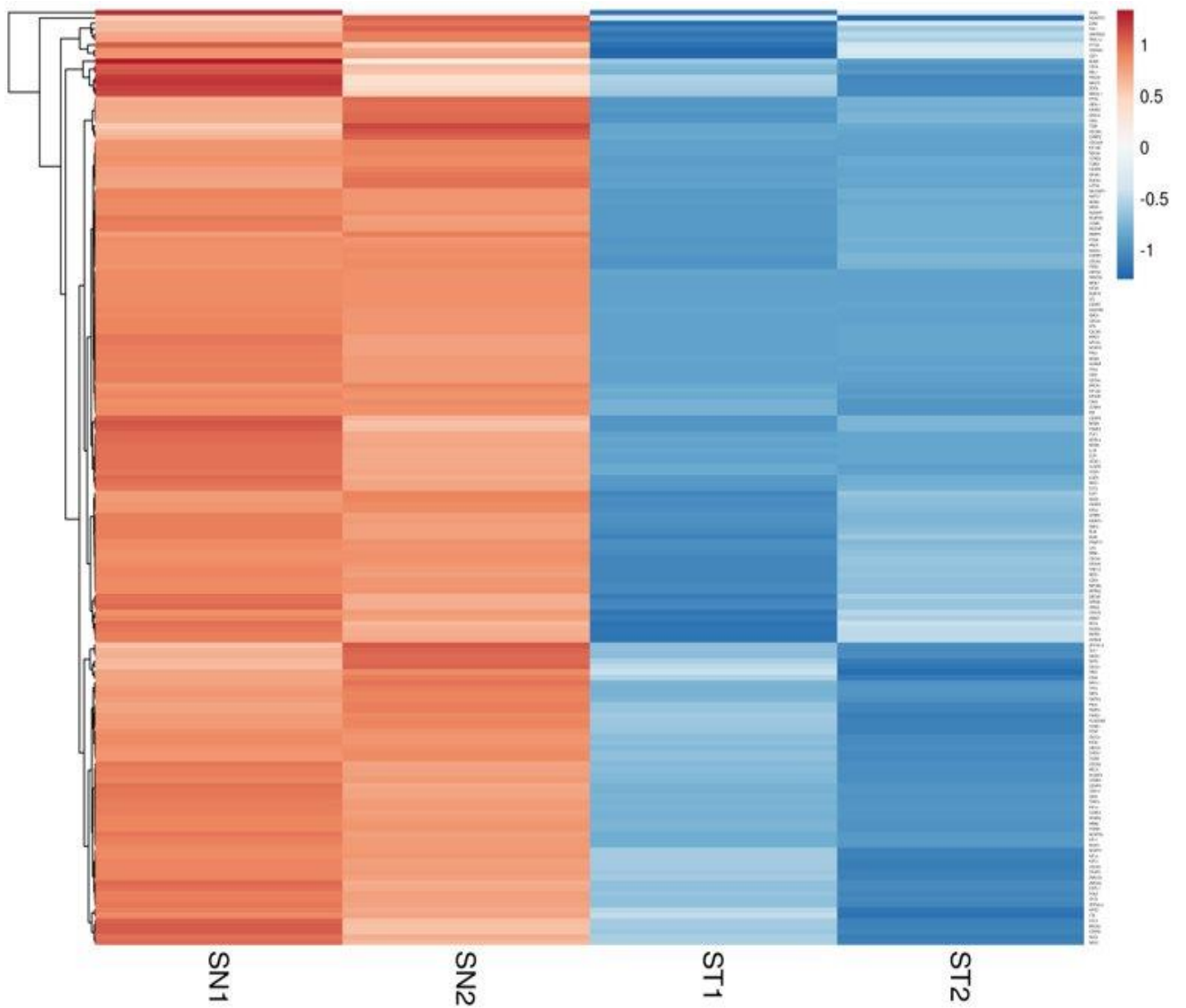


Fig. 28. *Heatmap* de los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST) a la baja. *Heatmap* los genes que participan en la vía de ciclo celular mitótico, arrojada en el análisis de ontología.

El análisis *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la baja entre células SCA7 tratadas y no tratadas, arrojó al *cluster* 1 con un puntaje de enriquecimiento de 28.92%. Este *cluster* representa a genes relacionados con división celular y mitosis (Fig. 29) que, como se observa en el mapa de calor del mismo (Fig. 30), se encuentra subrepresentado en las células SCA7 que fueron tratadas con el coctel FICB.

Functional Annotation Clustering (Enrichment score: 28.92%)

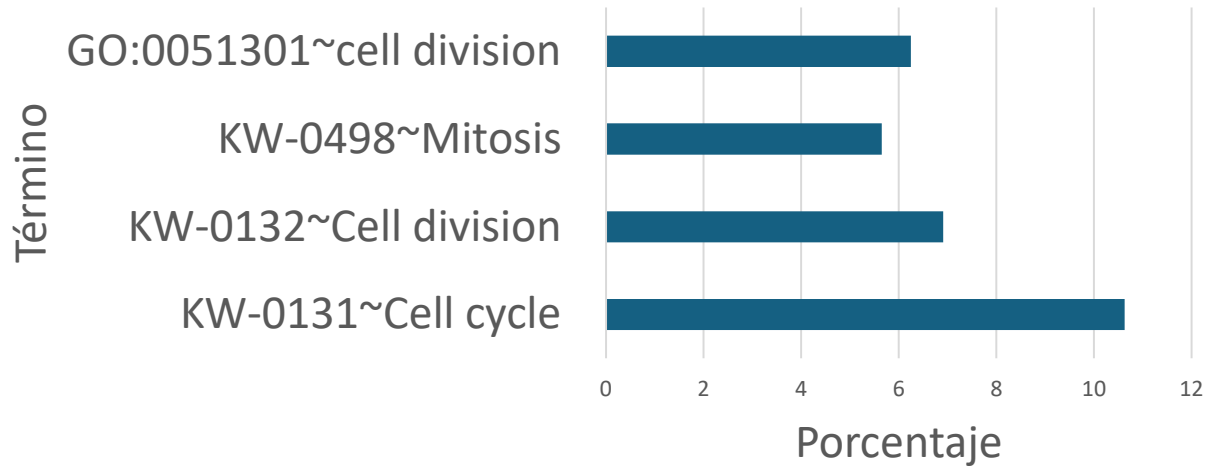


Fig. 29. Functional Annotation Clustering de los genes diferencialmente expresados a la baja entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) y tratados (ST). Se eligió el cluster 1 por ser aquel que muestra el mayor porcentaje de enriquecimiento (28.92%). Los términos agrupados se grafican de acuerdo a la cantidad de genes que representan.

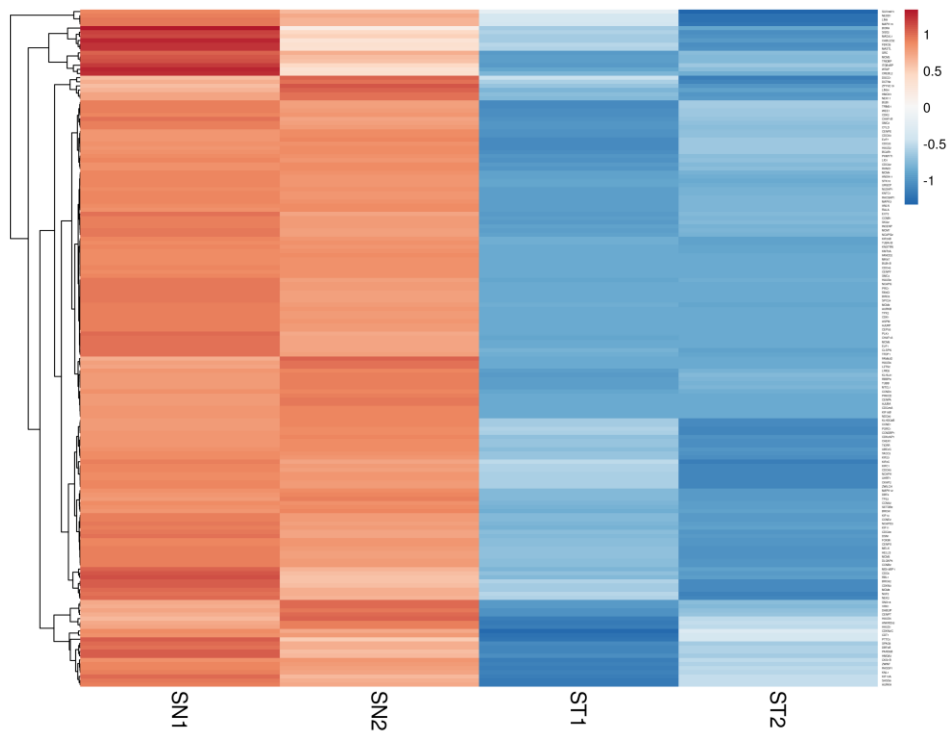


Fig. 30. Heatmap del *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la baja entre fibroblastos SCA7 no tratados (SN) tratados (ST). Se muestran todos los genes agrupados en el *cluster* 1 del análisis de anotación funcional.

4.5 Perfil transcripcional de las células SCA7 tratadas, en comparación con las células controles sanos tratadas: evaluación del impacto de la enfermedad en la diferenciación

Una vez que se verificó que el coctel FICB es capaz de inducir la diferenciación tanto en células control sano como en células con la patología de SCA7, se planteó indagar en las diferencias en el transcriptoma entre ambos fenotipos tratados. Para ello, se restó la contribución de las diferencias de facto que existen entre las células SCA7 y controles sanos sin el tratamiento (738 genes a la alza, y 578 genes a la baja), así como la contribución que se espera de la adición del coctel FICB entre células sin el tratamiento, y aquellas que sí lo recibieron (1322 genes a la alza, y 1269 genes a la baja). De este modo, se consideraron únicamente los genes que corresponden a las células control sano tratadas, en comparación con las células SCA7 tratadas (113 genes a la alza, y 578 genes a la baja), como el fragmento del transcriptoma que podría indicarnos la contribución de la patología en el proceso de diferenciación (Fig. 31).

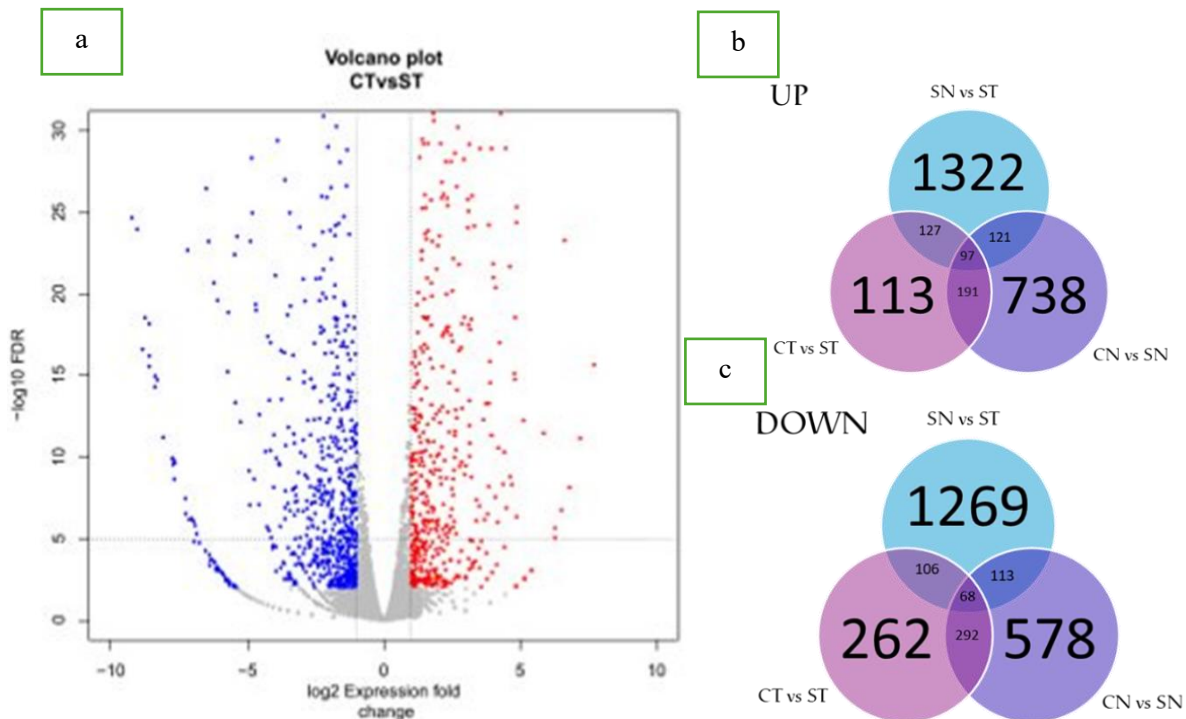


Fig. 31. Comparación del perfil transcriptómico entre fibroblastos controles sanos y fibroblastos SCA7, ambos con el tratamiento del coctel FICB. a. Volcano plot de los genes diferencialmente expresados entre células inducidas sanas y SCA7. b, c. Diagrama de venn de los genes diferencialmente expresados a la alza y a la baja, respectivamente, entre todas las condiciones: en azul, se muestran los genes diferencialmente expresados entre las células SCA7 sin tratamiento (SN), y las células SCA7 con tratamiento (ST); en morado, se muestran los genes diferencialmente expresados entre las células control sano (CN) y las células SCA7 (SN), ambas sin tratamiento; en rosa, se muestran los genes diferencialmente expresados entre las células control sano que recibieron el tratamiento (CT), y las células SCA7 que también fueron cultivadas con el coctel FICB (ST).

Al igual que en las comparaciones anteriores, se realizó un análisis de ontología y función biológica, únicamente de los genes diferencialmente expresados entre CT y ST a la alza. En este caso, las vías mayormente representadas a la alza, son vías con relación a la regulación negativa a la adhesión celular, desarrollo de tejidos, migración celular, motilidad y morfogénesis de la estructura anatómica (Fig. 32).

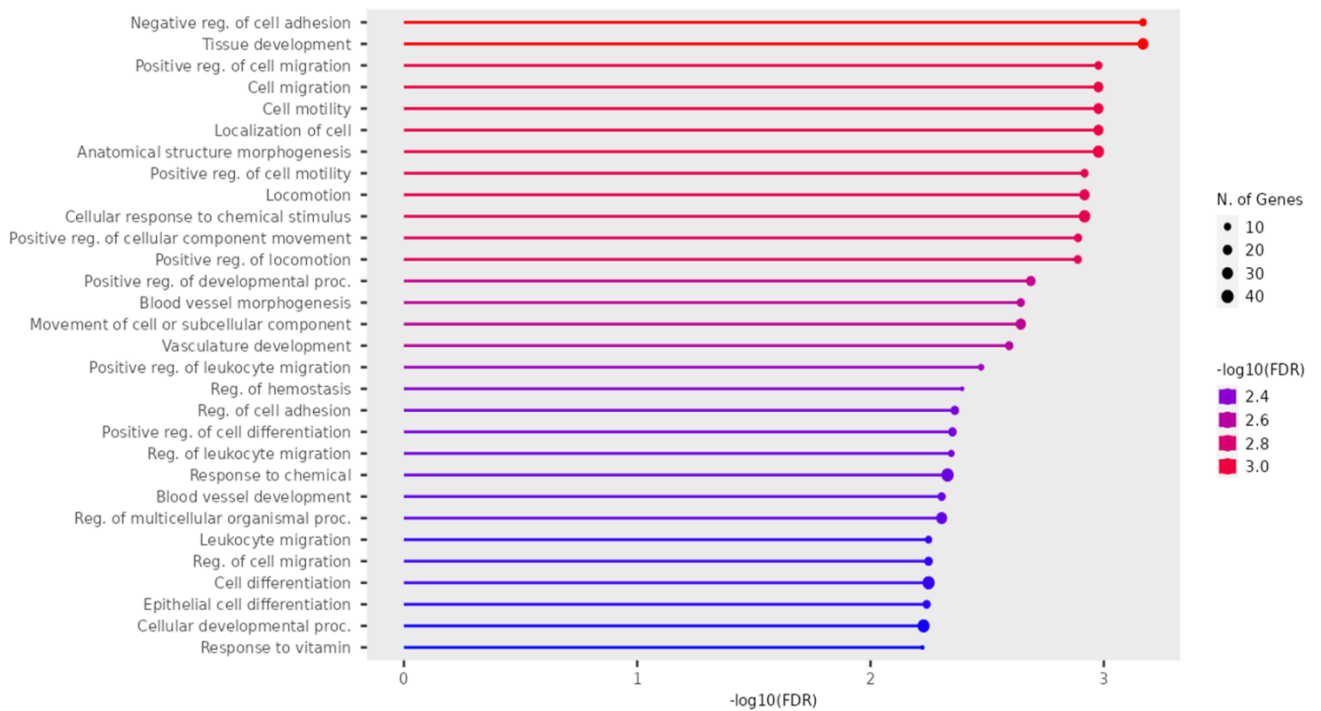


Fig. 32. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados a la alza, entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente. Muestra las 30 vías con mayor representación, ordenadas con respecto a la medida estadística $-\log_{10}(\text{FDR})$.

De igual manera, estos cambios de expresión a la alza se muestran en un mapa de calor, en donde se comparan los fibroblastos control sano tratados, y los fibroblastos SCA7 tratados (Fig. 33).

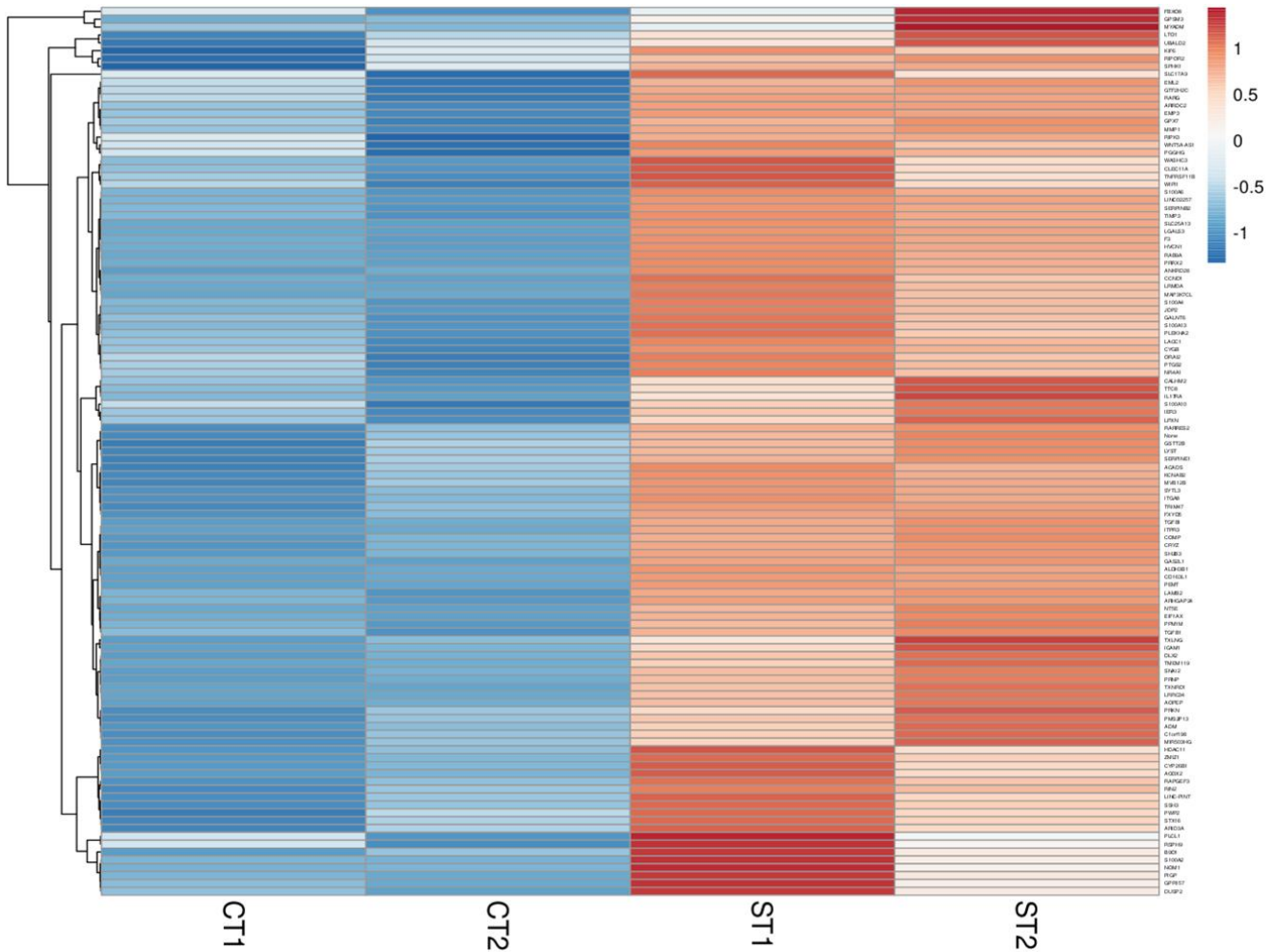


Fig. 33. Heatmap de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente. Heatmap los genes que participan en la vía de morfogénesis de la estructura anatómica, arrojada en el análisis de ontología.

En consecuencia, también se realizó un análisis *Functional Annotation Clustering*, en donde destacó el *cluster* 1 con un puntaje de enriquecimiento de 2.25%. Los genes que pertenecen a este *cluster* están relacionados con matriz extracelular, unión de integrinas y adhesión celular (Fig. 34).

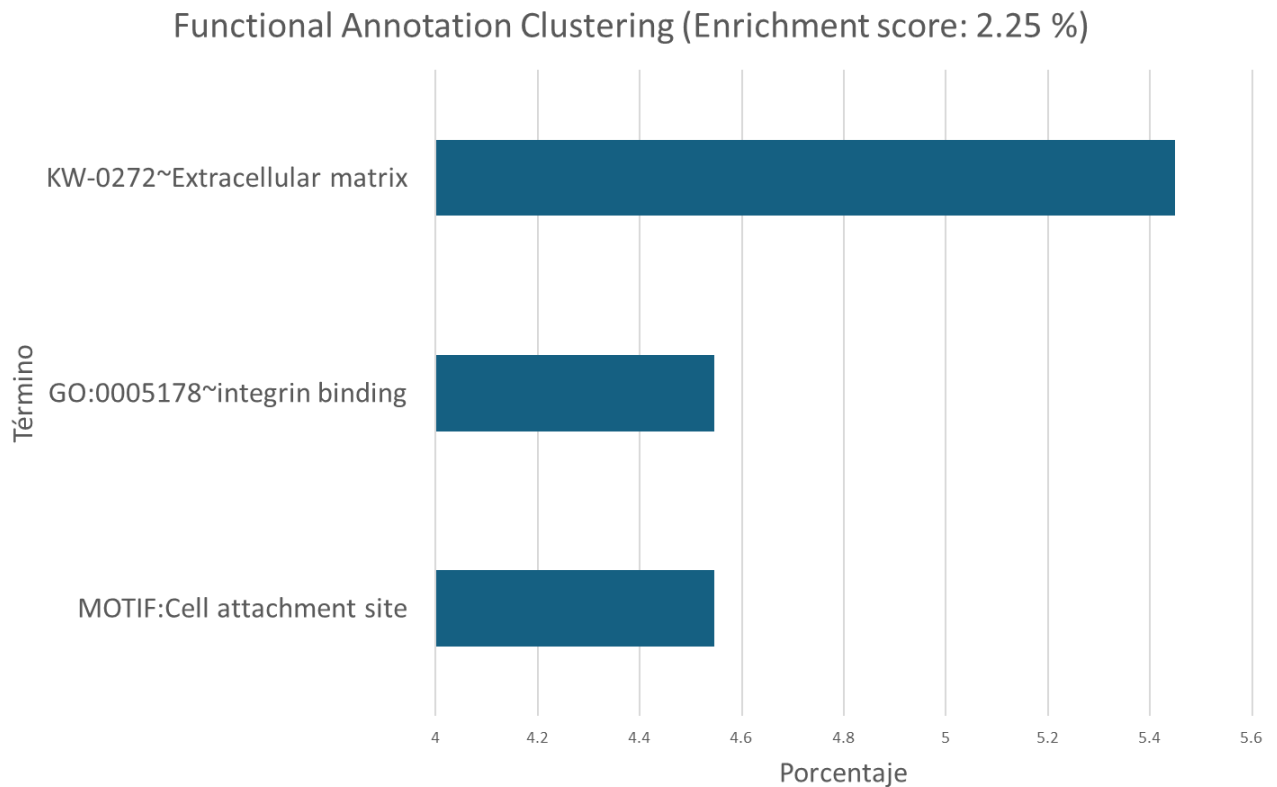


Fig. 34. *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente. Se eligió el *cluster* 1 por ser aquel que muestra el mayor porcentaje de enriquecimiento (2.25%). Los términos agrupados se grafican de acuerdo a la cantidad de genes que representan.

El mapa de calor muestra los cambios en la expresión de los genes relacionados a estas vías. En este caso, destacan genes como TIMP3, MMP1, e ITGA8, que participan en procesos de remodelación de la matriz extracelular (Fig. 35).

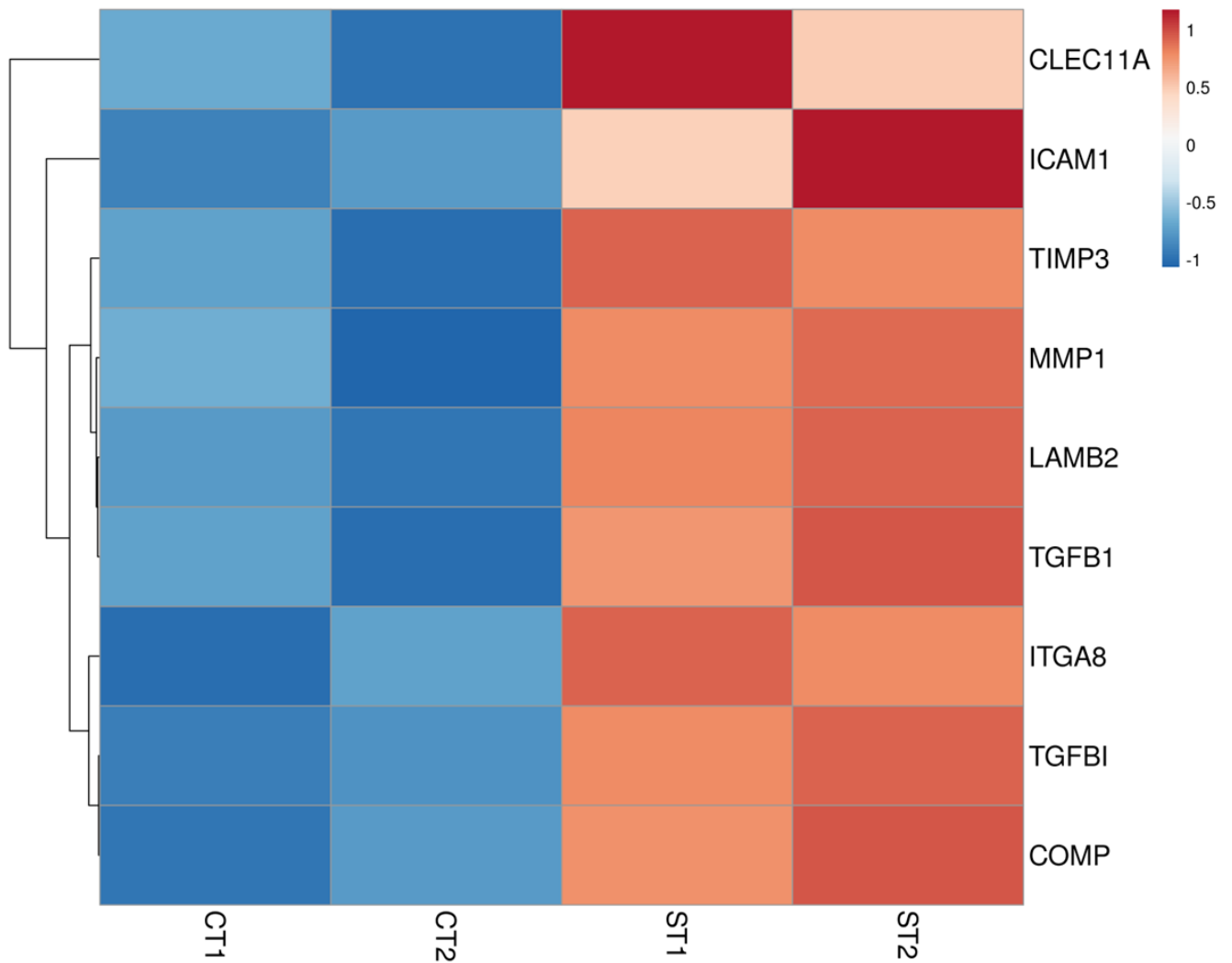


Fig. 35. Heatmap del *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la alza entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente. Se muestran todos los genes agrupados en el *cluster* 1 del análisis de anotación funcional.

En cuanto a los genes diferencialmente expresados a la baja entre estas condiciones (CT y ST), el análisis de ontología reveló que las vías mayormente subrepresentadas son aquellas con referencia al desarrollo del sistema nervioso (Fig. 36). Esto representa una diferencia importante entre el proceso de diferenciación de las células control y las células SCA7, siendo en estas últimas menos eficiente (Fig. 23). De igual manera, estos cambios se ven gráficamente representados en un mapa de calor (Fig. 37).

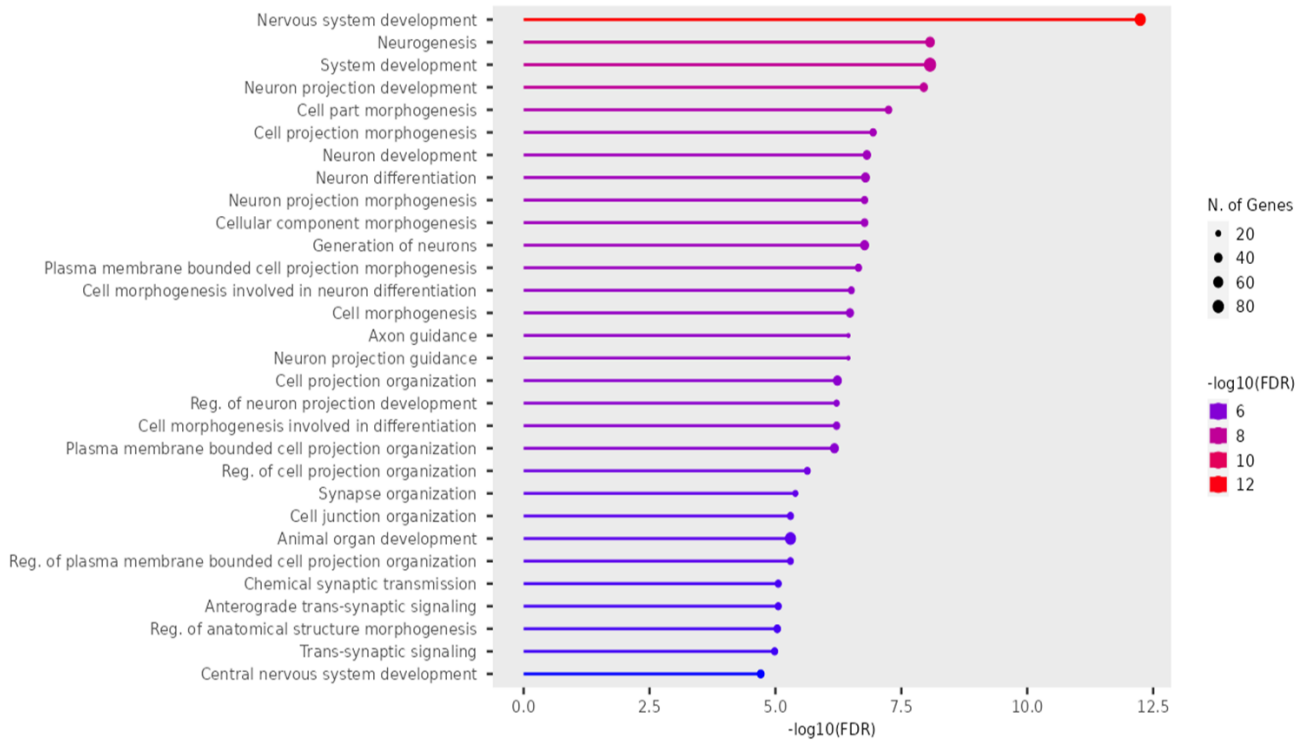


Fig. 36. Análisis de ontología y función biológica de los genes diferencialmente expresados a la baja, entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente. Muestra las 30 vías con mayor representación, ordenadas con respecto a la medida estadística $-\log_{10}(\text{FDR})$.

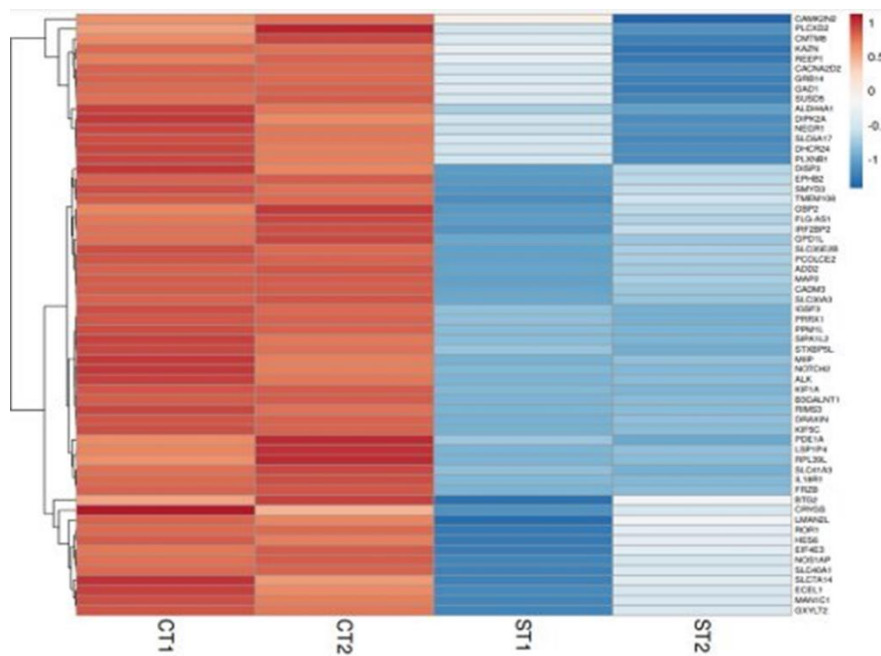


Fig. 37. Heatmap de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles tratados y SCA7 tratados únicamente. Heatmap los genes que participan en la vía de desarrollo de sistema nervioso, arrojada en el análisis de ontología

Con respecto al análisis *Functional Annotation Clustering*, se encontró que los genes subrepresentados se agrupan en términos relacionados con la integración de la membrana celular (Fig. 38). Del mismo modo, un mapa de calor muestra estos cambios entre las condiciones analizadas (Fig. 39 y 40).

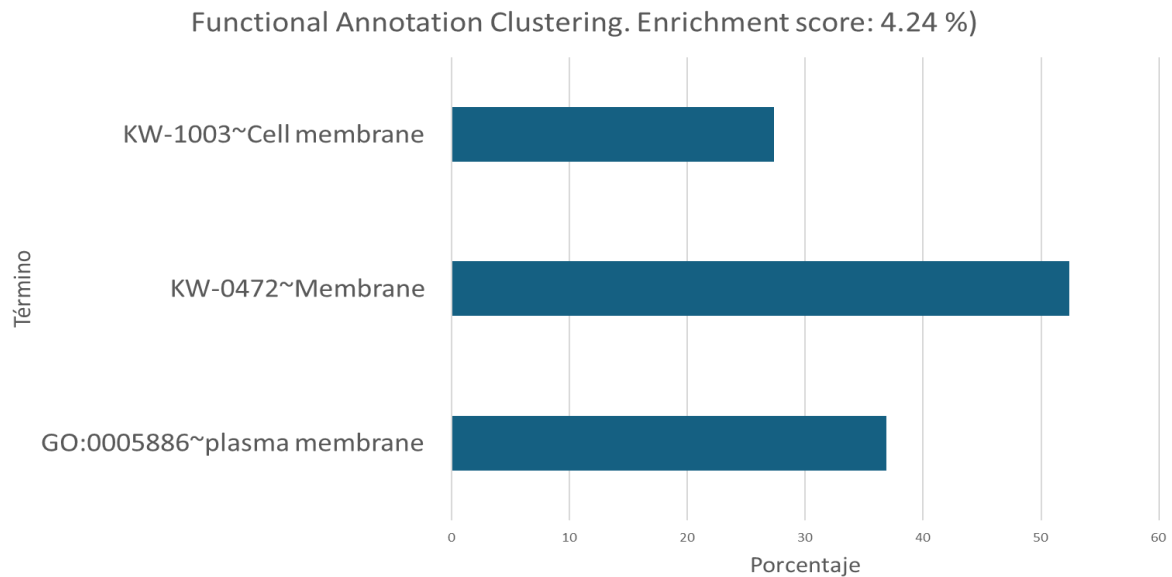


Fig. 38. Functional Annotation Clustering de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente. Se eligió el *cluster* 1 por ser aquel que muestra el mayor porcentaje de enriquecimiento (4.24%). Los términos agrupados se grafican de acuerdo a la cantidad de genes que representan.

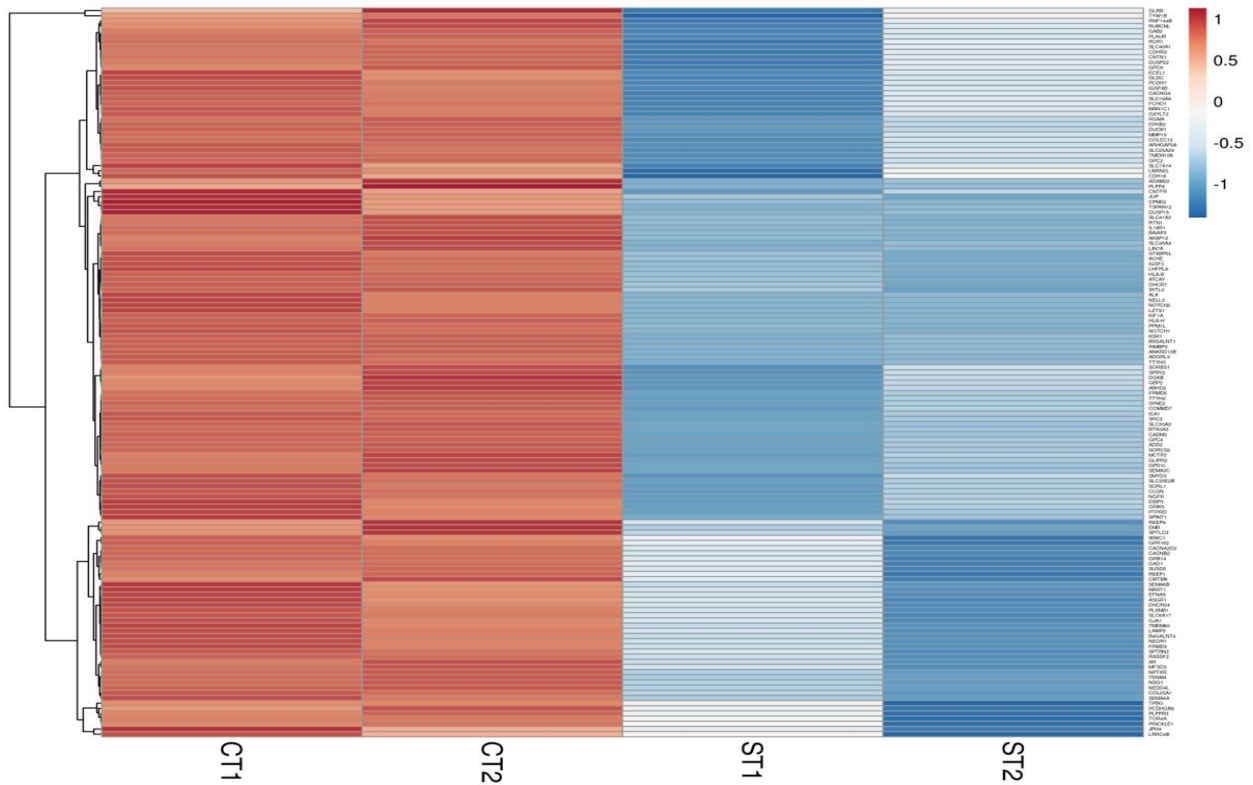


Fig. 39. Heatmap del *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente. Se muestran todos los genes agrupados en el *cluster* 1 del análisis de anotación funcional.

Por otra parte, se analizaron las diferencias en la expresión de diversos factores de transcripción relacionados con la neurogénesis, especialmente aquellos que se mostraron a la alza en el proceso de diferenciación de los fibroblastos controles sanos, como lo es el factor de transcripción CREB5. En este caso, se encontró una expresión diferencial negativa con respecto a los fibroblastos SCA7 diferenciados (Fig. 40).

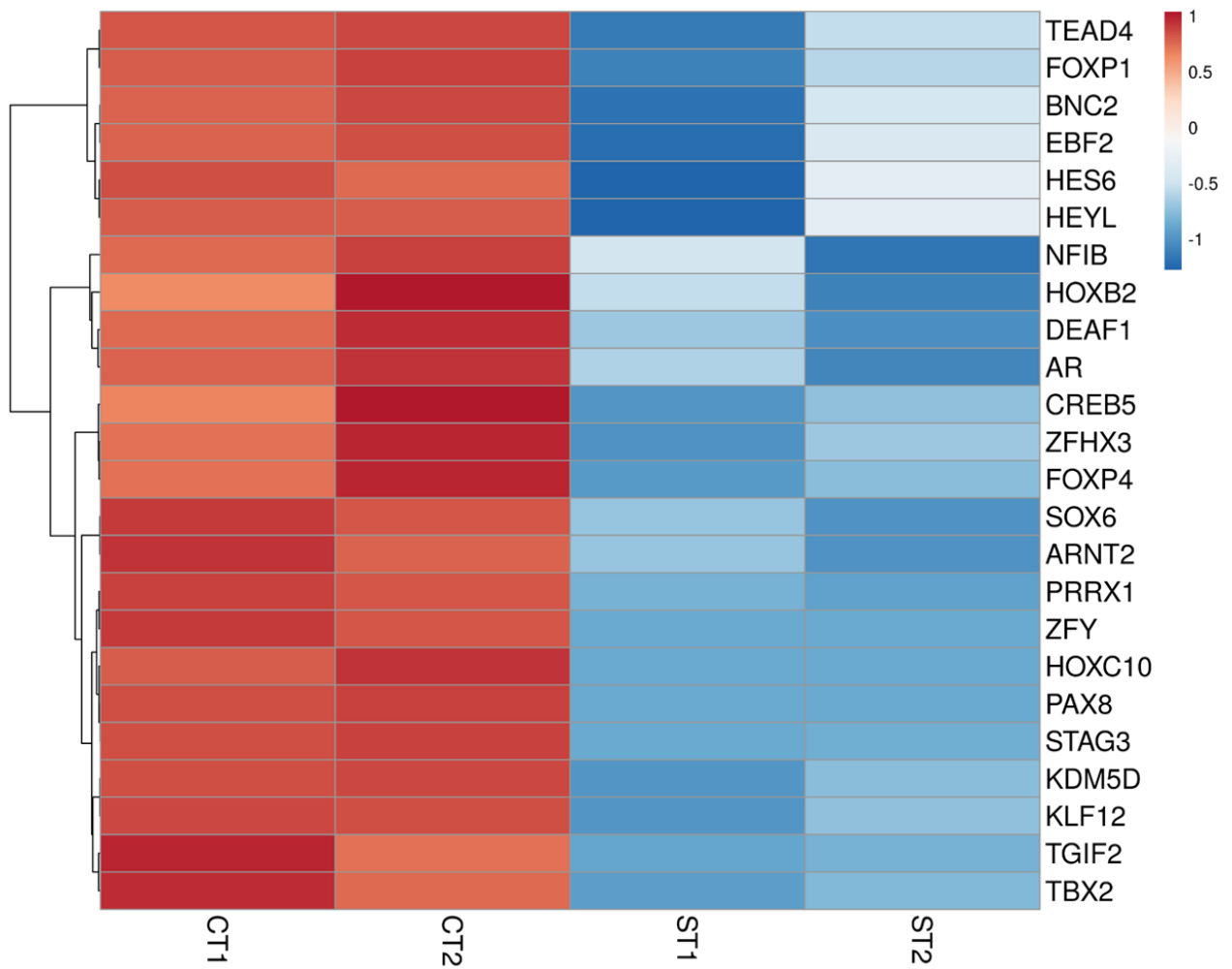


Fig. 40 Heatmap del *Functional Annotation Clustering* de los genes diferencialmente expresados a la baja entre controles sanos tratados (CT) y SCA7 tratados (ST) únicamente; énfasis en factores de transcripción. Se muestran todos los genes agrupados en el *cluster 1* del análisis de anotación funcional.

Discusión

Después de un tratamiento de 16 días en fibroblastos controles sanos y SCA7 con el coctel FICB, se obtuvieron células que presentan un cuerpo celular redondeado y prolongaciones citoplasmáticas que parten de él y se alargan a través de tiempo de diferenciación. Estos cambios morfológicos son consistentes con la estructura esperada en un fenotipo neural [30]

En este proceso de cambio, también destaca la expresión de los genes *Ngn2* y *NeuroD1*. Estos factores son importantes en el proceso de neurogénesis pues se considera que actúan de forma escalonada. *Ngn2* inicia el proceso en el que las células progenitoras neurales se comprometen con el linaje, al promover que las células se mantengan primero en un estado indiferenciado en el que se favorece su amplificación, y luego al orquestar la expresión de genes que continúan con el proceso. *NeuroD1* es uno de los genes influenciados por *Ngn2*, y controla el compromiso celular para llevar a la diferenciación terminal de las células neurales [31]. Li y colaboradores observan también este efecto en la reprogramación de fibroblastos de ratón hacia neuronas funcionales, inducida por el coctel FICB [20].

En este sentido, la disminución de la expresión de *CollA1* también puede considerarse como una característica positiva en el proceso de diferenciación. Este gen codifica la cadena alfa-1 del colágeno tipo 1, y participa en la estabilización estructural de la matriz extracelular de tejidos conectivos. Se trata de un factor especialmente encontrado en fibroblastos [32]. Esta reducción es consistente con lo observado en otros protocolos de reprogramación, como el reportado por Xiao y colaboradores en 2018, en donde se utiliza el factor de transcripción *Ptf1a* para inducir la reprogramación de fibroblastos hacia progenitores neurales [19].

De acuerdo con los análisis de secuenciación de RNA, destaca la expresión a la alza de genes relacionados con la neurogénesis, especialmente los genes *TUBB3*, *MAP2* Y *NEFH*. *TUBB3*, o Beta-III Tubulina, es un marcador clásico neuronal pues es la única isoforma de B-tubulina que se expresa de forma constitutiva en todas las neuronas, y no en células gliales. Además, también se ha demostrado que cumple un papel especial en la generación de axones periféricos [33]. *TUBB3*, además de presentarse en el análisis de RNA-Seq, también fue encontrado a la alza en las amplificaciones por PCR en tiempo real, y en las inmunofluorescencias de las células inducidas. *MAP2*, también hallado a la alza en el ensayo

de qPCR, es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa de forma ubicua en diversos tipos celulares neurales, y participa en actividades de transporte de carga axonal [34]. Por último, la cadena pesada de neurofilamentos (NF-H), forma parte de la estructura axonal, y se utiliza como un marcador para el daño neural [35]. En conjunto, la sobrerepresentación de las vías relacionadas con el desarrollo neural, y de marcadores clásicos neuronales, añaden a la identificación del cambio de linaje hacia una identidad neuronal.

En concordancia, se identificó una serie de factores de transcripción expresados a la alza, tanto en el proceso de diferenciación de los fibroblastos controles sanos, como en los fibroblastos SCA7. Destacan factores como CREB5, que regula procesos de crecimiento neuronal y plasticidad sináptica [36], además de ser un blanco río debajo del aumento de cAMP por Forskolina [26]; HOXA3, miembro de la familia HOX, que procesos de neurogénesis y el establecimiento de circuitos neurales [37]; y PRRX1, que juega un papel importante como *switch* para la determinación del linaje neural, y el mantenimiento de la renovación de las células neuronales progenitoras [38].

Durante el proceso de diferenciación, se observó un proceso de remodelación celular significativa, evidenciada por los cambios morfológicos visibles y la regulación negativa de genes relacionados con la morfogénesis y la organización del citoesqueleto. Estos cambios podrían indicar la pérdida de factores que resultaban importantes en el mantenimiento de la morfología de los fibroblastos, y no así de las células neurales, de forma similar a lo reportado en otros protocolos de reprogramación directa [39]. De igual manera, se presentan diferencias a la baja en genes relacionados con mitosis y ciclo celular, tales como AURKA y AURKB, lo cual indica que las células ya no se encuentran en división, sino comprometidas con el establecimiento del linaje [40].

Los cambios observados tanto a la alza como a la baja en las células control sano sostienen la hipótesis de una reprogramación efectiva hacia un linaje neural. De igual manera, las células SCA7 presentan aumentos en las vías relacionadas a la neurogénesis, y expresan a los marcadores neuronales clásicos TUBB3, NEFH y MAP2. Sin embargo, en estas células también se encontraron términos relacionados a glicoproteínas y puentes disulfuro a la alza, que incluyen a genes como ADAM y TIMP1. Estos genes participan en la remodelación de la matriz extracelular [41].

En cuanto a las diferencias en la reprogramación de las células controles sanos y con SCA7, se encontraron 113 genes relacionados a la patogénesis expresados a la alza, y 262 a la baja. A la alza, destacaron vías relacionadas con la adhesión celular, motilidad y morfogénesis, y en especial, genes que regulan la matriz extracelular, como TIMP3. Se ha reportado que TIMP3, un inhibidor de metaloproteasas de matriz, puede encontrarse alterado en distrofias retinianas hereditarias con afectación primaria de la mácula, al contener residuos de cisteína extra [42].

Una diferencia importante en esta comparación, es que a la baja se encuentran vías relacionadas a la neurogénesis, lo que sugiere deficiencias en la diferenciación de las células SCA7 con respecto a los controles. En especial, la comparación de factores de transcripción muestra que existen factores que se expresan en las células controles sanos diferenciadas, pero no en las células SCA7, tales como los antes descritos CREB5, miembros de la familia HOX y PRRX1. Por ello, resulta interesante el estudio de los genes regulados por estos factores de transcripción en SCA7 y su influencia en los mecanismos de patogenia.

Perspectivas

Como perspectivas del presente trabajo de investigación, resulta importante conocer la identidad de las células obtenidas en el proceso de reprogramación. De este modo, sería posible analizar los efectos de la enfermedad en células que se han evidenciado alteradas en SCA7, tales como las células de Purkinje [43].

Por otra parte, es de interés reconocer las propiedades electrofisiológicas de las células diferenciadas, tales como las propiedades de sus canales de iones dependientes de voltaje, y si los flujos de iones son consistentes con aquellos presentes en las neuronas maduras, tanto en las condiciones de células sanas, como en células con SCA7 [44]. Para ello, se propone el uso de la técnica Patch-clamp, que arroja información acerca de los flujos de iones Na^+ , Ca^{2+} , y K^+ , así como la capacidad de las células inducidas de generar potenciales de acción [45].

Además, utilizando como base el modelo celular aquí presentado, es necesario indagar acerca de los cambios epigenéticos que ocurren en SCA7, cambios que pudieran ocurrir en la organización de la cromatina, y disrupciones que pudieran presentar los dominios topológicamente asociados (TADs), como se ha reportado que ocurre en otras enfermedades poliglutamínicas como la enfermedad de Huntington [46, 47, 48].

Conclusiones

Las células inducidas presentan características morfológicas semejantes a las células de tipo neural, tales como la presencia de somas y prolongaciones dendríticas.

Las células inducidas expresan el marcador neuronal TUBB3, tanto a nivel transcrito como proteína. De igual forma, exhiben diferencias en la expresión de marcadores neurales y de fibroblasto, en comparación con los fibroblastos no tratados.

El perfil transcripcional muestra la sobrerrepresentación de marcadores neuronales en las células tratadas, así como de factores de transcripción relacionados con la neurogénesis.

La sobrerrepresentación de genes relacionados con la remodelación de la matriz extracelular, adhesión y señalización celular, pueden reflejar el intento de gestionar los procesos patológicos inducidos por la mutación en ATXN7, incluida la respuesta al estrés y la desregulación de la MEC.

Existen diferencias en la diferenciación asociadas a la patología, que podrían estar relacionadas con factores de transcripción que regulan los procesos de neurogénesis, tales como CREB5, PRRX1 y factores de la familia HOX.

En general, el protocolo presentado tiene la capacidad de convertir fibroblastos humanos sanos y de pacientes con SCA7, en células de tipo neural, de modo que constituye un modelo en el que se plantea indagar los mecanismos patogénicos de la ataxia espinocerebelosa de tipo 7.

Referencias

- [1] Niewiadomska-Cimicka, A., & Trottier, Y. (2019). Molecular targets and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Neurotherapeutics*, 16(4), 1074-1096
- [2] Karam, A., & Trottier, Y. (2018). Molecular mechanisms and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Polyglutamine Disorders*, 197-218
- [3] Harding, A. (1982). The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain: a journal of neurology*, 105(Pt 1), 1-28
- [4] Helmlinger, D., Hardy, S., Sasorith, S., Klein, F., Robert, F., Weber, C., ... & Devys, D. (2004). Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Human molecular genetics*, 13(12), 1257-1265.
- [5] Herbst, D. A., Esbin, M. N., Louder, R. K., Dugast-Darzacq, C., Dailey, G. M., Fang, Q., ... & Nogales, E. (2021). Structure of the human SAGA coactivator complex. *Nature structural & molecular biology*, 28(12), 989-996.
- [6] Garden, G. A., & La Spada, A. R. (2008). Molecular pathogenesis and cellular pathology of spinocerebellar ataxia type 7 neurodegeneration. *The Cerebellum*, 7, 138-149.
- [7] Helmlinger, D., Hardy, S., Abou-Sleymane, G., Eberlin, A., Bowman, A. B., Gansmüller, A., ... & Devys, D. (2006). Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFIIIC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLoS biology*, 4(3), e67.
- [8] Achour, M., Le Gras, S., Keime, C., Parmentier, F., Lejeune, F. X., Boutillier, A. L., ... & Merienne, K. (2015). Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Human molecular genetics*, 24(12), 3481-3496.
- [9] Ström, A. L., Forsgren, L., & Holmberg, M. (2005). A role for both wild-type and expanded ataxin-7 in transcriptional regulation. *Neurobiology of disease*, 20(3), 646-655.

- [10] Yu, X., Muñoz-Alarcón, A., Ajayi, A., Webling, K. E., Steinhof, A., Langel, Ü., & Ström, A. L. (2013). Inhibition of autophagy via p53-mediated disruption of ULK1 in a SCA7 polyglutamine disease model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 50, 586-599.
- [11] Ward, J. M., Stoyas, C. A., Switonski, P. M., Ichou, F., Fan, W., Collins, B., ... & La Spada, A. R. (2019). Metabolic and organelle morphology defects in mice and human patients define spinocerebellar ataxia type 7 as a mitochondrial disease. *Cell reports*, 26(5), 1189-1202.
- [12] Lebon, C., Behar-Cohen, F., & Torriglia, A. (2019). Cell death mechanisms in a mouse model of retinal degeneration in Spinocerebellar Ataxia 7. *Neuroscience*, 400, 72-84.
- [13] Alonso, E., Martínez-Ruano, L., De Biase, I., Mader, C., Ochoa, A., Yescas, P., ... & Rasmussen, A. (2007). Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. *Movement Disorders*, 22(7), 1050-1053.
- [14] García-Velázquez, L. E., Canizales-Quinteros, S., Romero-Hidalgo, S., Ochoa-Morales, A., Martínez-Ruano, L., Márquez-Luna, C., ... & Yescas-Gómez, P. (2014). Founder effect and ancestral origin of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) mutation in Mexican families. *Neurogenetics*, 15, 13-17.
- [15] Magaña, J. J., Gómez, R., Maldonado-Rodríguez, M., Velázquez-Pérez, L., Tapia-Guerrero, Y. S., Cortés, H., ... & Cisneros, B. (2013). Origin of the spinocerebellar ataxia type 7 gene mutation in Mexican population. *The Cerebellum*, 12, 902-905.
- [16] Yoo SY, Pennesi ME, Weeber EJ, Xu B, Atkinson R, Chen S, et al. SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron*. 2003;37(3):383-401
- [17] Yvert G, Lindenberg KS, Picaud S, Landwehrmeyer GB, Sahel JA, Mandel JL. Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Human molecular genetics*. 2000;9(17):2491-506.

- [18] Suárez-Sánchez, R., Ávila-Avilés, R. D., Hernández-Hernández, J. M., Sánchez-Celis, D., Azotla-Vilchis, C. N., Gómez-Macías, E. R., ... & Hernández-Hernández, O. (2022). RNA Foci Formation in a Retinal Glial Model for Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Life*, 13(1), 23.
- [19] Xiao, D., Liu, X., Zhang, M., Zou, M., Deng, Q., Sun, D., ... & Xiang, M. (2018). Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by single non-neural progenitor transcription factor *Ptf1a*. *Nature communications*, 9(1), 2865.
- [20] Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., ... & Deng, H. (2015). Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell stem cell*, 17(2), 195-203.
- [21] Wang, G., Zhang, D., Qin, L., Liu, Q., Tang, W., Liu, M., ... & Huang, B. (2024). Forskolin-driven conversion of human somatic cells into induced neurons through regulation of the cAMP-CREB1-JNK signaling. *Theranostics*, 14(4), 1701.
- [22] Deogracias, R., Espliguero, G., Iglesias, T., & Rodríguez-Peña, A. (2004). Expression of the neurotrophin receptor *trkB* is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(3), 470-480.
- [23] Bettio, L. E., Gil-Mohapel, J., Patten, A. R., O'Rourke, N. F., Hanley, R. P., Gopalakrishnan, K., ... & Christie, B. R. (2017). Effects of *Isx-9* and stress on adult hippocampal neurogenesis: Experimental considerations and future perspectives. *Neurogenesis*, 4(1), e1317692.
- [24] Bettio, L. E., Patten, A. R., Gil-Mohapel, J., O'Rourke, N. F., Hanley, R. P., Kennedy, S., ... & Christie, B. R. (2016). *ISX-9* can potentiate cell proliferation and neuronal commitment in the rat dentate gyrus. *Neuroscience*, 332, 212-222.
- [25] Lee, C., Robinson, M., & Willerth, S. M. (2018). Direct reprogramming of glioblastoma cells into neurons using small molecules. *ACS chemical neuroscience*, 9(12), 3175-3185.
- [26] Petrik, D., Jiang, Y., Birnbaum, S. G., Powell, C. M., Kim, M. S., Hsieh, J., & Eisch, A. J. (2012). Functional and mechanistic exploration of an adult neurogenesis-promoting small molecule. *The FASEB Journal*, 26(8), 3148.

- [27] Delepine, C., Pham, V. A., Tsang, H. W., & Sur, M. (2021). GSK3 β inhibitor CHIR99021 modulates cerebral organoid development through dose-dependent regulation of apoptosis, proliferation, differentiation and migration. *PLoS One*, 16(5), e0251173.
- [28] Delepine, C., Pham, V. A., Tsang, H. W., & Sur, M. (2021). GSK3 β inhibitor CHIR 99021 modulates cerebral organoid development through dose-dependent regulation of apoptosis, proliferation, differentiation and migration. *PLoS One*, 16(5), e0251173.
- [29] Qiao, Y., & Ivashkiv, L. B. (2015). Effect and mechanism of BET bromodomain inhibition in macrophage transcriptional programming. *Inflam Cell Signal*, 2(e600), 1-5.
- [30] Gullledge, A. T., & Bravo, J. J. (2016). Neuron morphology influences axon initial segment plasticity. *eneuro*, 3(1).
- [31] Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J. Y., & Brundin, P. (2009). Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PloS one*, 4(3), e4779.
- [32] Peyser, R., MacDonnell, S., Gao, Y., Cheng, L., Kim, Y., Kaplan, T., ... & Morton, L. (2019). Defining the activated fibroblast population in lung fibrosis using single-cell sequencing. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 61(1), 74-85.
- [33] Latremoliere, A., Cheng, L., DeLisle, M., Wu, C., Chew, S., Hutchinson, E. B., ... & Engle, E. C. (2018). Neuronal-specific TUBB3 is not required for normal neuronal function but is essential for timely axon regeneration. *Cell reports*, 24(7), 1865-1879.
- [34] Gumy, L. F., Katrukha, E. A., Grigoriev, I., Jaarsma, D., Kapitein, L. C., Akhmanova, A., & Hoogenraad, C. C. (2017). MAP2 defines a pre-axonal filtering zone to regulate KIF1-versus KIF5-dependent cargo transport in sensory neurons. *Neuron*, 94(2), 347-362.
- [35] Sellner, J., Davies, N. W., Howard, R. S., & Petzold, A. (2014). Neurofilament heavy chain as a marker of neuroaxonal pathology and prognosis in acute encephalitis. *European Journal of Neurology*, 21(6), 845-850.
- [36] Sharma, V. K., & Singh, T. G. (2020). CREB: a multifaceted target for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 17(14), 1280-1293.

- [37] Barber, B. A., & Rastegar, M. (2010). Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 192(5), 261-274.
- [38] Shimozaki, K., Clemenson, G. D., & Gage, F. H. (2013). Paired related homeobox protein 1 is a regulator of stemness in adult neural stem/progenitor cells. *Journal of Neuroscience*, 33(9), 4066-4075.
- [39] Wapinski, O. L., Vierbuchen, T., Qu, K., Lee, Q. Y., Chanda, S., Fuentes, D. R., ... & Wernig, M. (2013). Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell*, 155(3), 621-635.
- [40] Papp, B., & Plath, K. (2011). Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell research*, 21(3), 486-501.
- [41] Li, Z., Dang, J., Chang, K. Y., & Rana, T. M. (2014). MicroRNA-mediated regulation of extracellular matrix formation modulates somatic cell reprogramming. *Rna*, 20(12), 1900-1915.
- [42] Weber, B. H. (1998). Recent advances in the molecular genetics of hereditary retinal dystrophies with primary involvement of the macula. *Cells Tissues Organs*, 162(2-3), 65-74.
- [43] Garden, G. A., Libby, R. T., Fu, Y. H., Kinoshita, Y., Huang, J., Possin, D. E., ... & La Spada, A. R. (2002). Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 22(12), 4897-4905.
- [44] Cummins, T. R., Rush, A. M., Estacion, M., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2009). Voltage-clamp and current-clamp recordings from mammalian DRG neurons. *Nature protocols*, 4(8), 1103-1112.
- [45] Kornreich, B. G. (2007). The patch clamp technique: principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1), 25-37.
- [46] Yan, S., Zheng, X., Lin, Y., Li, C., Liu, Z., Li, J., ... & Li, S. (2023). Cas9-mediated replacement of expanded CAG repeats in a pig model of Huntington's disease. *Nature Biomedical Engineering*, 7(5), 629-646.

[47] Sun, J. H., Zhou, L., Emerson, D. J., Phyto, S. A., Titus, K. R., Gong, W., ... & Phillips-Cremins, J. E. (2018). Disease-associated short tandem repeats co-localize with chromatin domain boundaries. *Cell*, *175*(1), 224-238.

[48] Kessler, S., Minoux, M., Joshi, O., Ben Zouari, Y., Ducret, S., Ross, F., ... & Rijli, F. M. (2023). A multiple super-enhancer region establishes inter-TAD interactions and controls *Hoxa* function in cranial neural crest. *Nature Communications*, *14*(1), 3242.

Anexos

1. Script para análisis de datos de RNA-Seq en RStudio

```
setwd ("F:/RNAseq CiN")

getwd()

library(Rsubread)

bfiles = c ("CN1-sorted.bam","CN2-sorted.bam","CT1-sorted.bam", "CT2-sorted.bam",
"SN1-sorted.bam","SN2-sorted.bam", "ST1-sorted.bam", "ST2-sorted.bam")

fc <- featureCounts(files=bfiles,

                    annot.ext="F:/RNAseq
CiN/Homo_sapiens.GRCh38.84.gtf",isGTFAnnotationFile=T, useMetaFeatures=T,

                    minMQS=10, largestOverlap=T, isPairedEnd=F,

                    requireBothEndsMapped=F, nthreads=5)

library(edgeR)

library(limma)

samples <- factor (c( "CN","CN","CT","CT","SN","SN","ST","ST"))

DGEList_hum_RNAseq = DGEList(counts=fc$counts,

                              group=samples,

                              genes=fc$annotation[,c("GeneID","Length")])

keep = rowSums(cpm(DGEList_hum_RNAseq)>1) >= 3

sum(keep)

DGEList_hum_RNAseq = DGEList_hum_RNAseq[keep,]

design <- model.matrix(~0+samples)

colnames(design) <- levels(samples)

DGEList_hum_RNAseq=
```



```

calcNormFactors(DGEList_hum_RNAseq)

DGEList_hum_RNAseq =
  estimateDisp(DGEList_hum_RNAseq, design=design)

DGEList_hum_RNAseq$counts

library(RColorBrewer)

library(ggfortify)

color_all =
  c("darkblue","darkblue","darkred","darkred", "green", "green", "purple","purple")

plotMDS(DGEList_hum_RNAseq, cex=0.8,
        col=color_all)

dev.copy(pdf,"DGEList_hum_RNAseqALL.pdf")

dev.off()

PCA_log2CPM = prcomp(t(cpm(DGEList_hum_RNAseq,
                          log=T)), center=T, scale=T)

summary(PCA_log2CPM)

PCA_perc_var = round (((PCA_log2CPM$sdev^2 /
                        sum(PCA_log2CPM$sdev^2))*100), 1)

barplot(PCA_perc_var,
        names=colnames(PCA_log2CPM$x), main="Scree plot
RNAseq Humano ALL", xlab="Principal components", ylab="Percent Variation")

dev.copy(pdf,"Scree_plot-log2CPM-CiNALL.pdf")

dev.off

```

```

library(cluster)

color_samples <- c("darkblue", "darkred", "green", "purple")

PCA_var_lab = c(paste("PC1 - ", PCA_perc_var[1], "% var.", sep=""), paste("PC2 -",
PCA_perc_var[2], "% var.", sep=""))

plot(PCA_log2CPM$x[, "PC1"],
     PCA_log2CPM$x[, "PC2"],
     main="PCA de RNAseq Controles y Sca (no tratados y tratados)",
     xlab=PCA_var_lab[1],
     ylab=PCA_var_lab[2],
     col=color_all, pch=19)

legend(30, 20,
      legend = c("CN", "CT", "SN", "ST"),
      pch=19,
      col=c(color_samples[1], color_samples[3]),
      cex=0.9)

dev.copy(pdf, "PCA-log2CPM-hum_RNAALL.pdf")

dev.off()

#CN vs CT

fit <- glmFit(DGEList_hum_RNAseq, design)

contrasts = makeContrasts(CNvsCT=CT-CN,
                          levels=design)

lrt_hum <- glmLRT(fit, contrast=contrasts[,
                          "CNvsCT"])

```

```

DEG_hum <- as.data.frame(topTags(lrt_hum,
                                n=length(DGEList_hum_RNAseq$counts[,1])))
up = (DEG_hum$logFC > 1) & (DEG_hum$FDR < 1e-2)
write.table(DEG_hum[up,], "DEG-CNvsCT-Up.txt", sep="\t", quote=FALSE,
            row.names=FALSE)
down = (DEG_hum$logFC < -1) & (DEG_hum$FDR < 1e-2)
write.table(DEG_hum[down,], "DEG-CNvsCT-Down.txt", sep="\t", quote=FALSE,
            row.names=FALSE)
plot(DEG_hum$logFC[!(up | down)], -log10(DEG_hum$FDR[!(up | down)]), pch=19,
     col="gray", cex=0.4, xlab="log2 Expression fold
change", ylab="-log10 FDR", main="Volcano plot
CNvsCT", xlim=c(-10,10),ylim=c(0,30))
points(DEG_hum$logFC[up], -log10(DEG_hum$FDR[up]), pch=19, col="red",
       cex=0.4)
points(DEG_hum$logFC[down], -log10(DEG_hum$FDR[down]), pch=19, col="blue",
       cex=0.4)
abline(h=5, col="black", lty=3)
abline(v=c(-1,1), col="black", lty=3)
dev.copy(pdf, "Volcano_plot-CNvsCT.pdf")
dev.off()

log2_fpkm_hum_RNA = rpkm(DGEList_hum_RNAseq,
                        DGEList_hum_RNAseq$genes$Length, log=T)

```

```

log2_fpk_m_hum_RNA_average = rpkmByGroup(DGEList_hum_RNAseq, log=T)
fpkm2tpm_log2 <- function(fpkm) { fpkm -log2(sum(2^fpkm)) + log2(1e6) }
log2_tpm_hum_RNA = apply(log2_fpk_m_hum_RNA, 2,
                           fpkm2tpm_log2)
log2_tpm_hum_RNA_average = apply(log2_fpk_m_hum_RNA_average, 2,
                                  fpkm2tpm_log2)
write.table(log2_tpm_hum_RNA, "CNCT-TPM_log2.txt", sep="\t", quote=FALSE)
write.table(log2_tpm_hum_RNA_average, "CNCT-TPM_log2-average.txt", sep="\t",
            quote=FALSE)

```